

Fachbereich Biologie
- Mikrobiologie -



**Das marine Dimethylpropionat als protektives Osmolyt und die Evolution
verwandter ABC Transporter für die Aufnahme von kompatiblen Soluten**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat)

Sebastian Broy
aus Berlin

Marburg/Lahn, 2015

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2012 bis Februar 2015 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Prüfer:

Erstgutachter : Herr Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter : Herr Prof. Dr. Martin Thanbichler

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Herr Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Als Dissertation angenommen am: 05.05.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

In Zusammenarbeit mit der vorliegenden Dissertation wurde folgende Publikation veröffentlicht und Manuskript vorbereitet:

Broy S., Chen C., Hoffmann T., Brock N. L., Nau-Wagner G., Jebbar M., Smits S. H. J., Dickschat J. S., and Bremer E. (2014) Abiotic stress protection by ecologically abundant DMSP and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* DOI: 10.1111/1462-2920.12698

Broy S., *et al.* Molecular determination for substrat specificity for osmolytes of the ABC transporter OpuB and OpuC in *Bacillus subtilis*.

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I. Inhaltsverzeichnis | 4 |
| II. Abbildungsverzeichnis | 8 |
| III. Tabellenverzeichnis | 10 |
| III. Abkürzungsverzeichnis | 11 |
| Zusammenfassung | 12 |
| Summary | 13 |
| 1. Einleitung | 13 |
| 1.1 Osmostress Antwort bei <i>B. subtilis</i> | 14 |
| 1.1.1 Anpassung von <i>B. subtilis</i> an osmotische Stressbedingungen in der Umwelt..... | 14 |
| 1.1.2 „Salt-out“ Strategie | 15 |
| 1.2 Kompatible Solute..... | 16 |
| 1.2.1 Das umweltrelevante kompatible Solut DMSP | 18 |
| 1.2.2 Aufnahme von kompatiblen Soluten | 20 |
| 1.2.3 Endogene Synthese von Glycin Betain über Cholin in <i>B. subtilis</i> | 21 |
| 1.2.4 Prolinbiosynthese in <i>B. subtilis</i> | 22 |
| 1.3 Spezifische Transportsysteme vermitteln Akkumulation kompatibler Solute unter osmotischen Bedingungen bei <i>B. subtilis</i> | 24 |
| 1.3.1 Die ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC bei <i>B. subtilis</i> | 26 |
| 1.3.2 Die extrazellulären Substratbindeproteine von ABC Transportern..... | 27 |
| 1.3.3 Der „aromatische Cage“ und die Bindung von kompatiblen Soluten an die extrazellulären Substratbindeproteine | 28 |
| 1.3.4 Kationen π -Interaktionen in biologischen Systemen | 30 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 31 |
| 2. Material und Methoden | 33 |
| 2.1 Chemikalien und Materialien | 33 |
| 2.1.1 Kompatible Solute | 33 |
| 2.1.2 Radioaktive kompatible Solute..... | 33 |
| 2.1.3 Antibiotika | 34 |
| 2.2 Bakterienstämme , Plasmide und Oligonukleotide | 34 |
| 2.2.1 Bakterienstämme | 34 |
| 2.2.2 Plasmide..... | 36 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.3 Oligonukleotide | 36 |
| 2.3 Medien und Zusätze | 37 |
| 2.3.1 Kulturmedien | 37 |
| 2.3.2 Zusätze in den Kulturmedien | 39 |
| 2.4 Mikrobiologische Methoden | 39 |
| 2.4.1 Sterilisation | 39 |
| 2.4.2 Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Mikroorganismen | 39 |
| 2.4.3 Spektroskopischer Ermittlung der Zelldichte | 40 |
| 2.4.4 Transport Assays mit ¹⁴ C markierten kompatiblen Soluten | 40 |
| 2.5 Molekularbiologische und genetische Methoden | 41 |
| 2.5.1 Präparation von Nukleinsäuren | 41 |
| 2.5.2 PCR zur DNA Amplifikation | 42 |
| 2.5.3 Bestimmung der DNA Konzentration | 42 |
| 2.5.4 Zielgerichtete Mutagenese | 42 |
| 2.5.5 Sequenzierung von DNA | 43 |
| 2.5.6 Konstruktion von <i>B. subtilis</i> Stämmen mit Defekten in ihren Opu Transportsystemen | 43 |
| 2.5.7 Gelelektrophorese | 43 |
| 2.5.8 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> | 43 |
| 2.5.9 Transformation von <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> | 44 |
| 2.5.10 Konstruktion von Überexpressionssystemen für das Stargate® Klonierungssystem von IBA | 44 |
| 2.5.11 Bioinformatische Analysen | 45 |
| 2.6 Biochemische Methoden | 46 |
| 2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 46 |
| 2.6.2 Proteinbestimmung | 47 |
| 2.6.3 Heterologe Proteinexpression von Substratbindeproteinen von <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> | 47 |
| 2.6.4 Reinigung der Opu Substratbindeproteine von <i>B. subtilis</i> mittels Affinitätschromatographie und Ionenaustausch | 48 |
| 2.6.5 Ankonzentration gereinigter Proteine | 49 |
| 2.6.6 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Bindungsaffinitäten der extrazellulären Substratbindeproteine von <i>B. subtilis</i> | 49 |
| 2.6.7 Kristallisation von Proteinen | 50 |
| 2.6.8 Western Blot und Immundetektion | 50 |
| 2.6.9 Amylase-Test | 52 |
| 2.6.10 Bestimmung des intrazellulären Prolin Pools von osmotisch gestressten <i>B. subtilis</i> Zellen | 53 |
| 2.6.11 Bestimmung der TreA-Aktivität | 54 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3. Ergebnisse | 55 |
| 3.1 DMSP als kompatibles Solute bei <i>B. subtilis</i>..... | 55 |
| 3.1.1 DMSP als Kohlenstoff- oder Schwefelquelle..... | 55 |
| 3.1.2 Salz-, Kälte- und Hitzestress bei <i>B. subtilis</i> | 56 |
| 3.1.3 Regulatorischer Einfluss von DMSP und seinen Derivaten auf die Prolinbiosynthese und auf die Expression des <i>opuA</i> Operons | 59 |
| 3.1.4 Akkumulation von DMSP und seinen Derivaten über die Transporter OpuA und OpuC ... | 63 |
| 3.1.5 Kinetische Parameter bei der Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten bei den Transportern OpuA und OpuC | 65 |
| 3.1.6 Bindungsaffinitäten der extrazellulären SBP OpuAC und OpuCC zu DMSP und seine Derivate..... | 69 |
| 3.1.7 Bioinformatische Untersuchung über die Verteilung der Transporter OpuA und OpuC in der Gattung <i>Bacillus</i> | 74 |
| 3.2 Evolution der OpuB und OpuC Transporters bei <i>B. subtilis</i>..... | 74 |
| 3.2.1 Akkumulationsvermögen der Transportermutante OpuB (OpuBC D74D) mit verschiedenen Komptaiblen Soluten bei Salzstress..... | 77 |
| 3.2.2 Kinetische Parameter bei der Aufnahme verschiedener kompatibler Solute der OpuB (OpuBC D74T) Transportermutante..... | 80 |
| 3.2.3 Bindungsaffinitäten des extrazellulären SBP OpuBC (Wildtyp) und OpuBC (D74T) | 82 |
| 3.2.4 Kristallisation des OpuBC (D74T) Proteins mit verschiedenen Substraten und Auflösung der Bindungsstrukturen bei der Substratbindung..... | 84 |
| 3.2.5 Auswirkung auf die Akkumulation verschiedener kompatibler Solute bei der OpuC (OpuCC T74D) Transportermutante..... | 87 |
| 3.2.6 Kinetische Parameter bei der Aufnahme ausgewählter kompatibler Solute der OpuC (OpuCC T74D) Transportermutante..... | 89 |
| 3.2.7 Bioinformatische Analyse der OpuBC und OpuCC SBP in der Gattung <i>Bacillus</i> | 91 |
| 3.2.8 Stammbaum der Gattung <i>Bacillus</i> | 91 |
| 4. Diskussion | 94 |
| 4.1 Stressprotektion bei <i>B. subtilis</i> durch das ökologisch reichlich vorkommende DMSP und seinen natürlichen und synthetischen Derivaten..... | 94 |
| 4.1.1 Das kompatible Solute DMSP als „chemisches Chaperon“ | 95 |
| 4.1.2 Aufnahme von DMSP durch die OpuA und OpuC Transportsysteme..... | 97 |
| 4.1.3 Die Bindung von DMSP an die extrazellulären SBP OpuAC und OpuCC..... | 98 |
| 4.2 Evolution des OpuB Transporters..... | 99 |
| 4.2.1 Architektur des extrazellulären OpuBC Proteins..... | 100 |
| 4.2.2 Akkumulation von kompatiblen Soluten in Stämmen mit mutiertem OpuB bzw. OpuC Transporter..... | 102 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.3 Taxonomische Verbreitung der OpuB und OpuC Transporter..... | 105 |
| 4.3 Ausblick..... | 105 |
| 5. Literaturverzeichnis..... | 108 |
| 6. Anhang | 133 |
| 7. Danksagung..... | 143 |
| 8. Erklärung..... | 144 |
| 9. Lebenslauf..... | 145 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Osmostress Antwort bei <i>B. subtilis</i> . | 16 |
| Abbildung 2: Übersicht verschiedener kompatibler Solute. | 17 |
| Abbildung 3: Kompatible Solute als „chemisches Chaperone“. | 18 |
| Abbildung 4: Biosynthese und Schicksal von DMSP. | 19 |
| Abbildung 5: Aufnahme von Cholin und Biosynthese von Glycin Betain in <i>B. subtilis</i> unter hyperosmotischen Bedingungen. | 21 |
| Abbildung 6: Übersicht Prolinbiosynthese in <i>B. subtilis</i> . | 23 |
| Abbildung 7: Übersicht der verschiedenen ABC Transporter. | 25 |
| Abbildung 8: Strukturen der ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC und deren Lokalisierung im Genom von <i>B. subtilis</i> . | 26 |
| Abbildung 9: Organisation bakterieller SBP. | 27 |
| Abbildung 10: Bindungsstrukturen bei OpuAC, OpuBC und OpuCC mit Glycin Betain bzw. Cholin. | 29 |
| Abbildung 11: Plasmidkarte des pASK-IBA3 Vektors. | 45 |
| Abbildung 12: DMSP als Kohlenstoff- und Schwefelquelle bei <i>B. subtilis</i> . | 56 |
| Abbildung 13: Strukturformeln von Glycin Betain, DMSA, DMSP und die natürlichen und synthetischen Derivate. | 57 |
| Abbildung 14: Protektion von <i>B. subtilis</i> bei Salz-, Kälte- und Hitzestress. | 58 |
| Abbildung 15: Einfluss von DMSP und seinen Derivaten auf die <i>de novo</i> Synthese der intrazellulären Prolinkonzentration und auf die Expression des <i>proHJ</i> Operons über eine TreA Aktivitätsmessung. | 60 |
| Abbildung 16: Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten über die Transporter OpuA und OpuC unter osmotischen Bedingungen. | 63 |
| Abbildung 17: Transport von DMSP über OpuA und OpuC bei Kälte- und Hitzestress. | 65 |
| Abbildung 18: Aufnahme und Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von [1- ¹⁴ C] Glycin Betain beim OpuA Transporter in der Anwesenheit von DMSP als Inhibitor. | 66 |
| Abbildung 19: Aufnahme von [1- ¹⁴ C] Glycin Betain bei der Anwesenheit von DMSP und seinen Derivaten beim OpuC Transporter. | 67 |
| Abbildung 20: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von [1- ¹⁴ C] Glycin Betain durch den OpuC Transporter ohne und bei der Anwesenheit von DMSP und sein Derivaten. | 68 |
| Abbildung 21: Michaelis-Menten Kinetik bei der Bindungsaffinität von DMSP zu OpuAC. | 70 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 22: Fluoreszenzspektrum vom gereinigten OpuCC Protein mit verschiedenen kompatiblen Soluten..... | 71 |
| Abbildung 23: <i>In silico</i> Bindungsmodell von OpuAC und OpuCC mit DMSP.. | 72 |
| Abbildung 24: Proteinsequenz Alignment der OpuBC und OpuCC Proteine von <i>B. subtilis</i> . | 75 |
| Abbildung 25: Aromatische Bindungstasche des OpuBC und OpuCC Proteins mit verschiedenen kompatiblen Soluten..... | 76 |
| Abbildung 26: Western Blot nach einem Salzschock mit der OpuB Transportermutante..... | 78 |
| Abbildung 27: Protektion von <i>B. subtilis</i> Transportermutanten bei Salzstress..... | 78 |
| Abbildung 28: Protektion der OpuB Transportermutante mit verschiedenen kompatiblen Soluten bei Salzstress. | 79 |
| Abbildung 29: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiven kompatiblen Soluten durch die OpuB Transportermutante..... | 81 |
| Abbildung 30: Michaelis-Menten Kinetik bei der Bindungsaffinität von verschiedenen kompatiblen Soluten zu OpuBC (D74T)..... | 83 |
| Abbildung 31: Kristallstrukturen der Bindungstasche des OpuBC (D74T) Proteins mit verschiedenen kompatiblen Soluten..... | 85 |
| Abbildung 32: Western Blot nach einem Salzschock mit der OpuC Transportermutante..... | 88 |
| Abbildung 33: Protektion der OpuC Transportermutante mit verschiedenen kompatiblen Soluten bei Salzstress. | 88 |
| Abbildung 34: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiven kompatiblen Soluten durch die OpuC Transportermutante..... | 90 |
| Abbildung 35:..... | 92 |
| Abbildung 36: Schematische Übersicht über den Transportvorgang kompatibler Solute bei <i>B. subtilis</i> | 104 |
| Abbildung 37: Phylogenie der extrazellulären SBP OpuBC und OpuCC und ihre Organisation im Genom der Gattung <i>Bacillus</i> | 142 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 1: <i>E. coli</i> Stämme. | 34 |
| Tabelle 2: <i>B. subtilis</i> Stämme. | 35 |
| Tabelle 3: Verwendete Plasmide. | 36 |
| Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide. | 36 |
| Tabelle 5: Komponenten der Medien für <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i> | 38 |
| Tabelle 6: Antibiotika und Zusätze. | 39 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung für ein 15 %iges SDS-Gel. | 47 |
| Tabelle 8: Lösungen für den Western-Blot. | 52 |
| Tabelle 9: Repression der OpuA Expression mit verschiedenen kompatiblen Soluten. | 62 |
| Tabelle 10: Zusammenfassung der Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiven Substanzen und die Bindungsaffinitäten verschiedener kompatibler Solute im mutierten OpuB Transportsystem. | 84 |
| Tabelle 11: Bioinformatische Analyse über die Verteilung des OpuA und OpuC Transporters in <i>Bacillus</i> | 133 |
| Tabelle 12: Alignment der OpuBC und OpuCC Proteine bei <i>Bacillus</i> | 136 |

III. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------|
| A | Adenin |
| AHT | Anhydrotetracyclin |
| Amp | Ampicillin-Resistenz |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| C | Cystein |
| C-terminal | Carboxyl-terminal |
| Cm ^R | Chloramphenicol-Resistenz |
| DMSP | Dimethylsulfoniopropionat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Ery ^R | Erythromycin-Resistenz |
| G | Guanin |
| GB | Glycin Betain |
| Genta ^R | Gentamycin-Resistenz |
| Kan ^R | Kanamycin-Resistenz |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| MMA | Minimal-Medium A |
| N-terminal | Amino-terminal |
| NaCl | Natriumchlorid |
| OD ₅₇₈ | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578nm |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| pNPG | para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SMM | Spizizen's Minimal-Medium |
| T | Thyamin |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyldiamin |
| Tet ^R | Tetracyclin-Resistenz |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |

Zusammenfassung

Die tertiäre Schwefelverbindung Dimethylsulfoniopropionat (DMSP) wird von marinen Organismen (z. B. Algen) und wenigen Landpflanzen in hohen intrazellulären Konzentrationen synthetisiert und weltweit werden jährlich 10^9 Tonnen hergestellt. DMSP dient den Produzenten als Osmolyt und gelangt z. B. durch Lyse der Zellen in Folge einer viralen Infektion ins Meerwasser. DMSP ist als Vorläufermolekül von Dimethylsulfid (DMS) ein wichtiger Bestandteil des globalen Schwefelkreislaufes und nimmt indirekt Einfluss auf das weltweite Klima. Mitglieder der Gattung *Bacillus* kolonisieren eine Vielzahl unterschiedlicher Habitats (u. a. marine Sedimente) und haben daher Zugang zu DMSP. Eines der best untersuchten Mikroorganismen aus der Gattung *Bacillus* ist *B. subtilis*. Ein Forschungsschwerpunkt von *B. subtilis* liegt auf seiner Anpassungsfähigkeit (z. B. Osmoregulation) und Adaption an sich stetig verändernde Umweltbedingungen.

Mit einem definierten Set von *B. subtilis* Stämmen wurden die protektiven Eigenschaften von DMSP als kompatibles Solute bei Salz-, Kälte - und Hitzestress aufgedeckt. DMSP wird von *B. subtilis* nicht verstoffwechselt, sondern dient einzig als kompatibles Solut. Auch natürliche und synthetische Derivate zeigten Osmoprotektion und teilweise Kälteprotektion bei gestressten *B. subtilis* Zellen. Wie bereits für andere kompatible Solute gezeigt wurde nimmt auch DMSP und seine Derivate Einfluss auf die *de novo* Synthese des intrazellulären Prolin Pools und auf das osmotisch induzierte *opuA* Operon. DMSP und seine Derivate reprimieren die Expression der Gene für die Prolinbiosynthese und die Expression des OpuA Transporters bei hoher Osmolarität des Wachstumsmediums. Die Akkumulation von DMSP in allen Stressbedingungen erfolgte über die ABC Transporter OpuA und OpuC, wobei sich OpuC als Haupttransporter von DMSP und seinen Derivaten herausstellte. Der OpuC Transporter besitzt ein breites Spektrum an kompatiblen Soluten die durch das extrazelluläre Substratbindeprotein (SBP) OpuCC gebunden werden. Mit Bindungsassays und einem *in silico* Modell konnte die Bindung von DMSP charakterisiert werden. Die Substratspezifität des OpuC Transporters ist bemerkenswert, während der OpuB Transporter nur Cholin transportiert. Der OpuB Transporter ist aus einer Genduplikation des OpuC Transporters im Laufe der Evolution entstanden und hat sich auf die Aufnahme von Cholin spezialisiert. Mit bioinformatischen Analysen, Mutagenese der extrazellulären SBP von OpuBC und OpuCC und mit Kristallisationsstudien des mutierten OpuBC Proteins wurde die molekulare Anpassung im Hinblick auf die Substratspezifität der OpuB und OpuC Systeme beschrieben.

Summary

The tertiary sulfonium compound dimethylsulfoniopropionate (DMSP) is produced in vast amounts by marine macroalgae and phytoplankton and also by a restricted number of plants. These organisms used DMSP as a stress protectant and upon cell lysis or viral infection DMSP can be released into open ocean water. It is an integral constituent of the global sulfur cycle and DMSP is the precursor of the climatically active gas DMS. Members of the genus *Bacillus* can colonize a great variety of ecosystems and certainly have access to DMSP. In *B. subtilis* the protection against abiotic stress are well characterized, but it is unknown whether it catabolizes DMSP and/or can derived stress protection from DMSP.

With a well characterized set of *B. subtilis* strains has been found, that DMSP is not a nutrient for *B. subtilis*, but it served as an excellent stress protectant against salt, cold and heat challenges. Also its natural selenium and synthetic derivatives served as osmostress and partially cold stress protectant, but DMSP was the more effective stress protectant. DMSP and its derivatives influenced the size of the osmostress-adaptive proline pool and reduced the salt-induced expression of the *opuA* operon. DMSP uptake by osmotically and temperature-stressed *B. subtilis* cells are mediated by the ABC transporter OpuA and OpuC. The OpuC transporter was the main transporter not only for DMSP uptake, but also for its natural and synthetic derivatives. The ABC transporter OpuC is a remarkable osmolyte import system, because its substrat specificity is extremely broad. In contrast, the related OpuB transporter exhibited transport activity only for choline. The OpuB transporter were developed due a gene dublication event out of the OpuC transporter. With bioinformatics assessment, site-directed mutagenesis and crystallographic studies were the molecular determents of the ligand binding-site characterized.

1. Einleitung

Im Jahr 150 v. Chr. beschloss der römische Senat die Zerschlagung des karthagischen Reiches. Ein Jahr später rückten römische Truppen aus um die Stadt Karthago zu belagern. Nach drei Jahren Belagerung eroberten die römischen Truppen innerhalb von sechs Tagen die Stadt und versklavten die übrig gebliebenen Bewohner. Im Zuge der Zerstörung der Stadt, so sagt die Legende, streuten die Römer Salz auf den Boden. Damit wollten sie den Boden für alle Zeiten unfruchtbar machen.

Mikroorganismen kommen ubiquitär in allen Lebensräumen vor und sind damit in der Lage jegliche ökologische Nische zu besetzen (Curtis and Sloan, 2004; Earl *et al.*, 2008; Logan and De Vos, 2009). Im Laufe der Evolution haben sich Mikroorganismen an verschiedenste abiotische Bedingungen wie Temperatur, Druck, Osmolarität, Strahlung, pH-Wert und an die schwankende Verfügbarkeit von Nährstoffen angepasst (Kempf and Bremer, 1998; Aertsen and Michiels, 2004). Das Bodenbakterium *B. subtilis* ist ein gram-positives Bakterium und eines der am besten untersuchten Modellorganismen für zelluläre und molekularbiologische Studien (Lopez *et al.*, 2008; Earl *et al.*, 2008; Barbe *et al.*, 2009). Als typisches Bodenbakterium ist *B. subtilis* verschiedensten Schwankungen in den Bodenumweltbedingungen ausgesetzt. Insbesondere bei Schwankungen in der Osmolarität in der Umgebung (z. B. durch Sonneneinstrahlung oder Überschwemmungen) ist *B. subtilis* in der Lage durch verschiedenste Anpassungsstrategien sein Überleben zu sichern (Kempf and Bremer, 1998; Wood, 1999; Bremer and Krämer, 2000; Oren, 2008).

1.1 Osmostress Antwort bei *B. subtilis*

1.1.1 Anpassung von *B. subtilis* an osmotische Stressbedingungen in der Umwelt

Regenfälle oder erhöhte Sonneneinstrahlung nehmen großen Einfluss auf die Verfügbarkeit von Wasser im Boden ein (insbesondere in den oberen Schichten) und damit beeinflussen sie die Osmolarität in der Umgebung der Mikroorganismen. Damit sich Mikroorganismen teilen können benötigen sie ein gegen die Zellwand ausgeübten Druck, der Turgor, der bei *B. subtilis* 1.9 MPa beträgt (Holtje, 1998; Whatmore and Reed, 1990; Holtmann and Bremer, 2004). Der Turgor ist abhängig von den gelösten Teilchen im Zellinneren in Relation zu den gelösten Teilchen des umgebenden Mediums (Bremer and Krämer, 2000). Schwankungen des osmotischen Potentials haben erheblichen Einfluss auf den Wasserfluss zwischen dem

Zytoplasma der Zelle und der Umgebung. Bei hyperosmotischen Bedingungen strömt Wasser in die Zelle, was den Turgor dermaßen erhöhen kann, dass die Zelle droht zu platzen. Bei hypoosmotischen Bedingungen strömt Wasser aus dem Zytoplasma der Zellen, was den Turgor verringert und die Aufrechterhaltung der zellulären Prozesse nicht mehr gewährleistet (Bremer, 2002; Earl *et al.*, 2008; Pittelkov and Bremer, 2011). Mikroorganismen können nicht aktiv ihren Wasserhaushalt steuern, denn Zellmembranen sind durchlässig für Wasser (Booth *et al.*, 2007). Einige Mikroorganismen besitzen membrandurchspannende Wasserkanäle, die Aquaporine, mit denen sie selektiv Wasser über die Zellmembran transportieren können, allerdings sind deren physiologische Rolle noch nicht vollständig geklärt (Calamita *et al.*, 1995; Calamita *et al.*, 1998; Soupene *et al.*, 2002 ; Benga, 2012). *B. subtilis* besitzt keine Aquaporine, sondern steuert den Wasserhaushalt vielmehr direkt über eine gezielte Änderung des osmotischen Potenzials im Zytoplasma der Zelle (Kempf and Bremer, 1998; Wood, 1999; Bremer and Krämer, 2000; Tanghe *et al.*, 2011).

1.1.2 „Salt-out“ Strategie

Wie bereits vorher erwähnt, muss *B. subtilis* bei hyperosmotischen Bedingungen (hohe Salzkonzentrationen im umgebenden Medium) sein osmotisches Potenzial im Zytoplasma beibehalten. Neben anderen halotoleranten Bakterien verfolgt *B. subtilis* dabei die „Salt-out“-Strategie (Bremer and Krämer, 2000). In Abbildung 1 ist die „Salt-out“-Strategie zusammengefasst, die aus zwei aufeinander folgenden Anpassungsstrategien besteht. Im ersten Schritt werden K^+ -Ionen durch die Transporter KtrCD und KtrAB transportiert, was zur Stabilisierung des Turgors führt. Beide Transporter transportieren neben K^+ -Ionen vermutlich zusätzlich auch Na^+ -Ionen (Holtmann and Bremer, 2004; Corratge-Faillie *et al.*, 2010). Sehr hohe Kalium Konzentrationen im Zytoplasma sind aus noch nicht vollständig verstandenen Gründen toxisch für die Zelle. Unter anderem wirken sich die hohen Konzentrationen hemmend auf die Proteinbiosynthese aus. Daher werden die K^+ -Ionen im zweiten Anpassungsschritt durch kompatible Solute ersetzt. Die kompatiblen Solute werden durch spezialisierte Transportsysteme, die Opu Transporter (Osmoprotectant uptake), in das Zellinnere transportiert (siehe Opu Transporter 1.3) (Bremer, 2002). Verschiedenste kompatible Solute können von *B. subtilis* über die ABC-Transporter OpuA, OpuB und OpuC bzw. über die sekundären Transporter OpuD und OpuE akkumuliert werden (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002; Bashir *et al.*, 2014a,b). Kompatible Solute fungieren aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften als neutrale Osmolyte, die das osmotische Potenzial ausgleichen und als „chemische Chaperone“, die unter anderem Proteine stabilisieren (siehe 1.2).

Neben der Aufnahme von kompatiblen Soluten kann *B. subtilis* Glycin Betain aus Cholin und Proline *de novo* synthetisieren (siehe 1.2.3 und 1.2.4). Aus energetischen Gründen werden die Solute hauptsächlich bei nicht Vorhandensein von externen kompatiblen Soluten synthetisiert (Oren, 1990; Pittelkov and Bremer, 2011; Brill *et al.*, 2011 a,b; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Sind externe kompatible Solute (z.B. Glycin Betain) aufgenommen worden können sie Einfluss auf die Expression von osmotisch induzierten Genen nehmen, z.B. wird die Prolinbiosynthese über das *proHJ*-Operon beeinflusst (Brill *et al.*, 2011 a,b) oder der Expression des *opuA* Operons von Glycin Betain reprimiert (Hoffmann *et al.*, 2013; Bashir *et al.*, 2014a,b; Kohlstedt *et al.*, 2014).

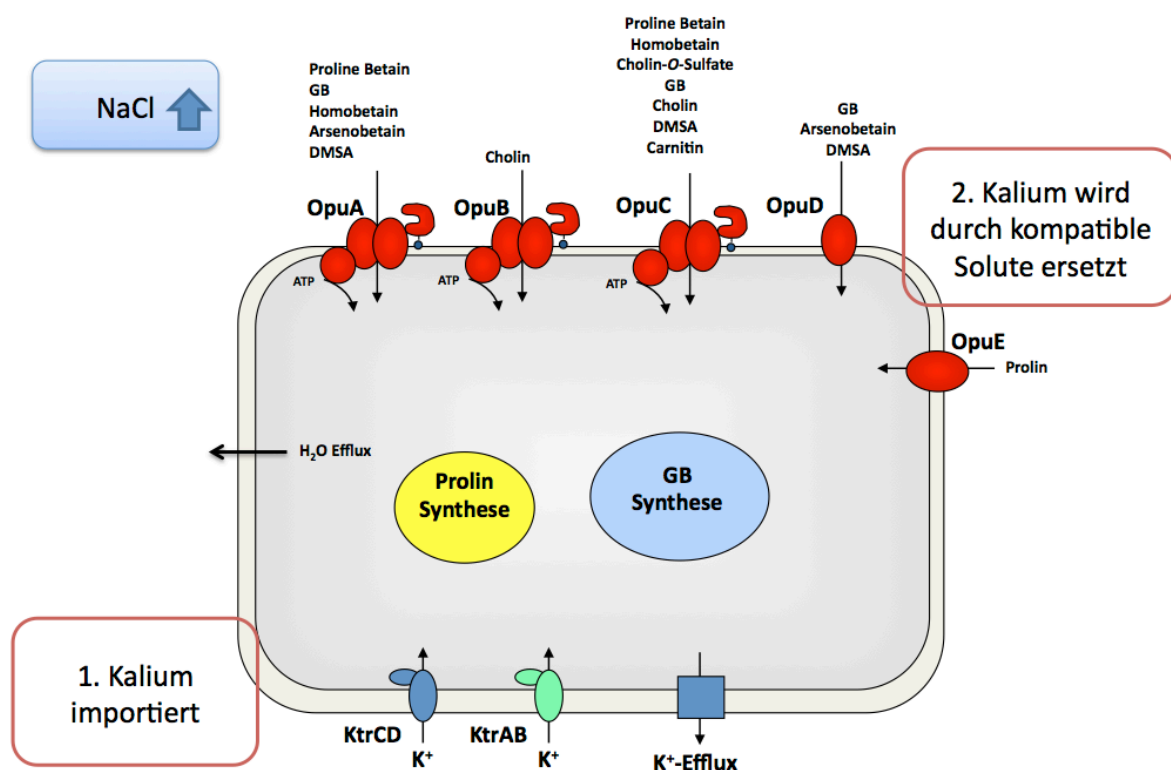


Abbildung 1: Osmostress Antwort bei *B. subtilis*. *B. subtilis* Anpassungsstrategie unter hyperosmotischen Bedingungen besteht aus zwei Antworten. Im ersten Schritt werden K⁺-Ionen akkumuliert, die im zweiten Schritt durch kompatible Solute ersetzt werden. Durch diese Anpassungsschritte ist es *B. subtilis* möglich sein Turgor aufrechtzuerhalten und unter hochosmolaren Bedingungen zu wachsen. Außerdem ist *B. subtilis* in der Lage Glycin Betain über Cholin als Vorläufermolekül zu synthetisieren (Nau-Wagner *et al.*, 2012) und Prolin unter diesen Bedingungen *de novo* zu synthetisieren (Brill *et al.*, 2011a). Quelle: modifiziert nach Pittelkov and Bremer, 2011.

1.2 Kompatible Solute

Kompatible Solute sind wasserlösliche, ladungsneutrale, organische Substanzen (Zwitterion), die bis zu hohen molaren Konzentrationen im Zytoplasma akkumuliert werden können, ohne

dabei den Zellmetabolismus zu beeinflussen (Csonka, 1989). In Abbildung 2 sind die chemischen Strukturen wichtiger kompatibler Solute gezeigt. Die verschiedenen kompatiblen Solute lassen sich verschiedenen Stoffklassen zuordnen: den Aminosäuren und Aminosäurederivate (z. B. Glutamat, Prolin, Ectoin und Prolin Betain), den Zuckern (z. B. Trehalose), den Trimethylammonium-Verbindungen und deren Sulfonium-Analoga (z. B. Glycin Betain, Carnitin und DMSP) und den Sulfatestern (z. B. Cholin-O-Sulfat) (Kempf and Bremer, 1998; Bremer and Krämer, 2000; Pittelkov and Bremer, 2011).

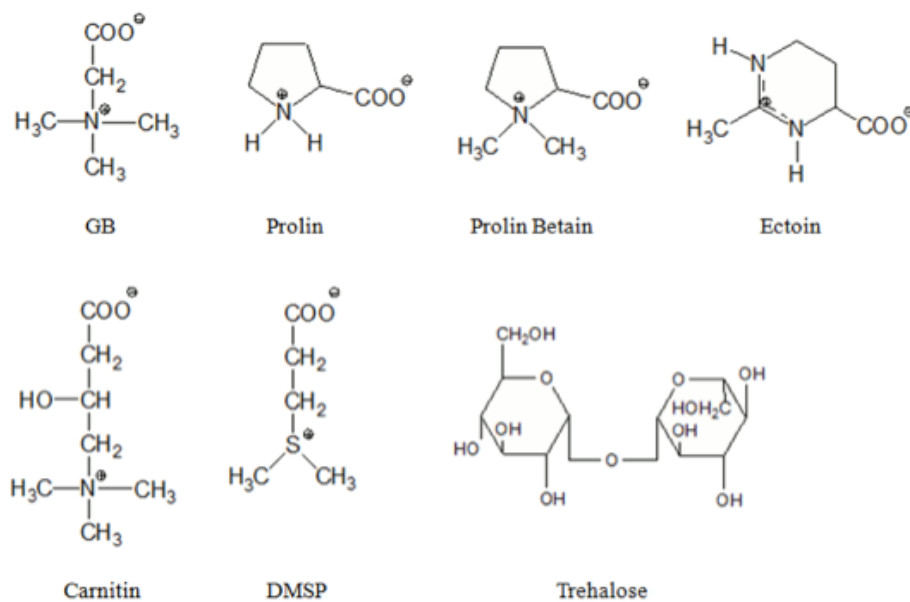


Abbildung 2: Übersicht verschiedener kompatibler Solute. Hier sind Strukturformeln wichtiger kompatibler Solute in Mikroorganismen dargestellt. In dieser Arbeit sind Glycin Betain und DMSP die kompatiblen Solute die im Vordergrund stehen.

Kompatible Solute wirken als Osmoprotektiva, schützen die Zelle bei Kälte und Hitze, stabilisieren Nukleinsäuren, stabilisieren Membranen und unterstützen Proteine bei ihrer korrekten Faltung (Holtmann and Bremer, 2004; Hinch and Hagemann, 2004; Pastor *et al.*, 2010; Hoffmann and Bremer, 2011, Bashir *et al.*, 2014a,b). Da sie Proteine beim korrekten falten unterstützen, werden sie auch als „chemische Chaperone“ bezeichnet, diese proteinstabilisierende Wirkung konnte bereits *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Lippert and Galinski, 1992; Diamant *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 2004; Street *et al.*, 2006). Ihre unterstützende Eigenschaft wird dabei durch das „preferential exclusion model“ erklärt (siehe Abbildung 3) (Blasiak *et al.*, 2006; Pastor *et al.*, 2010). In dem Modell sind die kompatiblen Solute aus der Hydrathülle des Proteins ausgeschlossen. Dadurch lagern sich die Solute in ein gewissen Abstand um das Protein herum an und unterstützen dabei das Protein seine native Konformation einzunehmen.

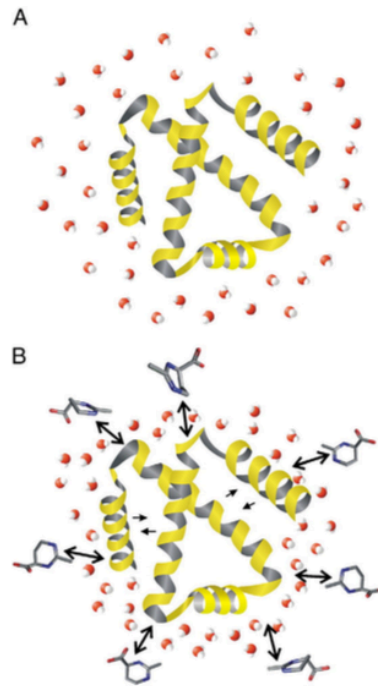


Abbildung 3: Kompatible Solute als „chemisches Chaperone“. Gezeigt ist die Stabilisierung eines Proteins mit dem kompatiblen Solute Ectoin. (A) Natives Protein mit Hydrathülle. (B) Kompakt gefaltetes Protein wo die Hydrathülle von Ectoin verdrängt wird. In hyperosmotischen Bedingungen sorgt es für die Aufrechterhaltung der nativen Konformation des Proteins. Quelle: Pastor *et al.*, 2010.

Eines der weitverbreitesten und effektivsten kompatiblen Solute ist Glycin Betain, es kommt in Mikroorganismen (z. B. in *B. subtilis*), in Pflanzen und selbst in menschlichen Organismus vor (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Yancey, 2005; Lever and Slow, 2010; Giri, 2011; Goel *et al.*, 2011). Glycin Betain kann von *B. subtilis* über Cholin als Vorläufermolekül synthetisiert werden (siehe 1.2.3) oder durch die ABC-Transporter OpuA, OpuC und OpuD aufgenommen werden (siehe Abbildung 1). In den letzten Jahren hat DMSP als Umweltrelevantes kompatibles Solut an Bedeutung gewonnen, dass in riesigen Mengen von marinen Algen und Phytoplankton synthetisiert wird (siehe 1.2.1). Physiologische und kinetische Studien von DMSP in osmotisch gestressten *B. subtilis* Zellen waren eines der Schwerpunkte in dieser Arbeit.

1.2.1 Das umweltrelevante kompatible Solut DMSP

Das kompatible Solut DMSP wird in riesigen Mengen (10^9 Tonnen pro Jahr) von marinen Algen und Phytoplankton produziert und ist ein wichtiger Bestandteil des weltumspannenden Schwefelkreislaufs und wird sogar in der Krebstherapie eingesetzt (Carlson *et al.*, 1987; Kiene *et al.*, 2000; Kiene and Linn, 2000; Hehemann *et al.*, 2014; Nakajima *et al.*, 2014). Neben marinen Mikroorganismen wird es auch von Landpflanzen produziert (Yoch, 2002; Otte *et al.*, 2004; Curson *et al.*, 2011; Reisch *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012). Die Synthese

von DMSP startet mit der Aminosäure L-Methionin und führt über mehrere enzymatische Reaktionen zum Endprodukt DMSP, allerdings unterscheiden sich die einzelnen Schritte im Syntheseweg bei den verschiedenen DMSP produzierenden Organismen (Challenger and Simpson, 1948; Green, 1964; Barnard *et al.*, 1984; Hanson *et al.*, 1994; Rainia *et al.*, 2013; Dickschat *et al.*, 2014). Die unterschiedlichen Synthesewege haben sich vermutlich unabhängig voneinander entwickelt (Dickschat *et al.*, 2014). Bei den Produzenten fungiert DMSP als Osmolyt und Anti-Stress Molekül in salzreichen Umgebungen, kann aber auch von Nichtproduzenten aufgenommen werden, die es als Osmoprotektiva oder als Nährstoffquelle nutzen können (Karsten *et al.*, 1992; Kiene *et al.*, 1999; Welsh, 2000; Sunda *et al.*, 2002; Todd *et al.*, 2007; Curson *et al.*, 2011a,b; Rinta-Kanto *et al.*, 2011; 2012; Levine *et al.*, 2012; Todd *et al.*, 2012; Murdock *et al.*, 2014). Daneben ist es ein wichtiger Bestandteil im weltweiten Schwefelkreislauf und wird mit dem weltweiten Klima in Verbindung gebracht (siehe Abbildung 4) (Vallina and Simó, 2007; Hehemann *et al.*, 2014).

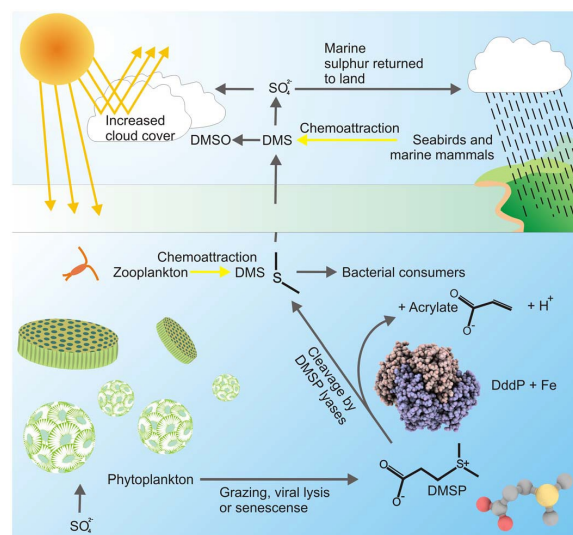


Abbildung 4: Biosynthese und Schicksal von DMSP. DMSP wird von marinen Algen und Phytoplankton aus L-Methionin akkumuliert und kann durch Lyse oder virale Infektionen der Zellen ins Seewasser gelangen und von Nichtproduzenten aufgenommen werden. DMSP wird über zwei enzymatische Stoffwechselwege katabolisiert (Reisch *et al.*, 2011; Todd *et al.*, 2012). Die Demethylierung von DMSP stellt eine wichtige Schwefel und Kohlenstoffquelle vor Mikroorganismen dar und ist der Hauptabbauweg von DMSP (Kiene *et al.*, 1999; Reisch *et al.*, 2011). Ein alternativer Abbauweg ist die Spaltung von DMSP, die über DMSP Lyasen vermittelt wird (Curson *et al.*, 2011a,b). Bei diesem Abbauweg entstehen Acrylate und DMS. DMS kann in die Atmosphäre diffundieren und wird dort mit Sulfat-Verbindungen für die Bildung von Wolken in Beziehung gebracht. (Hehemann *et al.*, 2014).

DMSP wird von marinen Algen und Phytoplankton produziert und wird durch Lyse, virale Infektionen und Abgrassung in das Seewasser entlassen. Dort können kleinste

Konzentrationen von μM bis nM nachgewiesen werden (Kiene *et al.*, 1998; Van Duyl *et al.*, 1998; Vila-Costa *et al.*, 2006). Das freie DMSP wirkt als chemotaktisches Molekül, wird von Mikroorganismen aufgenommen und von diesen Mikroorganismen als Osmoprotektiva genutzt oder katabolisiert (Karsten *et al.*, 1992; Wolfe *et al.*, 1997; Kiene *et al.*, 1999; Sunda *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004; Curson *et al.*, 2011a,b; Reisch *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012). Die Katabolisierung von DMSP kann über zwei Abbauewege erfolgen. Der Hauptabbaueweg ist die Demethylierung von DMSP und dient als Quelle für Schwefel- und Kohlenstoffe für die Mikroorganismen (Kiene *et al.*, 1999; Reisch *et al.*, 2011). Beim alternativen Abbaueweg wird DMSP in Acrylate und DMS gespalten. Die Spaltung wird über das Enzym DMSP-Lyase vermittelt (Karsten *et al.*, 1992; Wolfe *et al.*, 1997; Sunda *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004; Curson *et al.*, 2011a,b; Reisch *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012). Nur ein geringer Anteil wird in DMS gespalten (2 - 12%) und kann aus dem Seewasser in die Atmosphäre diffundieren (Kiene and Linn, 2000). Hier dient DMS zusammen mit Sulfat (SO_4^{2-}) als Keim für eine Wolkenbildung. Die CLOW-Hypothese besagt, dass dadurch das Phytoplankton das weltweite Klima beeinflussen kann (Sunda *et al.*, 2002; Quinn and Bates, 2011).

1.2.2 Aufnahme von kompatiblen Soluten

Kompatible Solute gelangen durch abgestorbenes Pflanzenmaterial, Wurzelabscheidungen, verwesenden Tieren oder durch Mikroorganismen in den Boden und können dann von anderen Mikroorganismen aufgenommen werden (Welsh, 2000). *B. subtilis* besitzt mit den Opu Transportern OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE hochaffine und spezialisierte Transporter die eine Vielzahl von kompatiblen Soluten in die Zelle transportieren können (siehe Abbildung 1) (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002). Neben der Aufnahme von kompatiblen Soluten synthetisiert *B. subtilis* Glycin Betain aus Cholin, während Prolin *de novo* von *B. subtilis* synthetisiert werden kann (siehe 1.2.3 und 1.2.4 für Details). Aus energetischen Gründen wird die Akkumulation von kompatiblen Soluten von der Zelle bevorzugt (Dinnbier *et al.*, 1988; Oren, 1990; Higgins, 1992; Akashi and Gojobori, 2002; Pittekov and Bremer, 2011). Glycin Betain wird von OpuA, OpuC und OpuD aufgenommen (siehe Abbildung 1). Die Aufnahme von Glycin Betain erfolgt in einem hochaffinen Bereich mit K_m Werten für Glycin Betain bei OpuA von 3 μM , OpuC 6 μM und OpuD 13 μM bei Salzstress (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Bremer, 2002). Der OpuB Transporter transportiert ausschließlich Cholin mit einem K_m Wert von 1 μM (Kappes *et al.*, 1999). Der Transporter OpuE transportiert ausschließlich Prolin, auch hier besteht eine hohe Affinität von Prolin zum Transporter (K_m Wert von 20

μM) (von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter and Bremer, 1998). Die Opu Transporter unterscheiden sich teilweise sehr stark untereinander in ihrer Substratspezifität (siehe Abbildung 1 und 8).

1.2.3 Endogene Synthese von Glycin Betain über Cholin in *B. subtilis*

B. subtilis kann über die Transporter OpuB und OpuC Cholin aus der Umwelt aufnehmen. OpuB transportiert nur Cholin und sonst keine anderen kompatiblen Solute, während OpuC ein breites Substratspektrum besitzt (siehe Abbildung 8). Die kinetischen Parameter der Transporter für Cholin bewegen sich im niedrig affinen Bereich vom K_m Wert $1 \mu\text{M}$ bei OpuB und K_m Wert $38 \mu\text{M}$ bei OpuC (Kappes *et al.*, 1999). Allerdings ist Cholin nicht osmoprotektiv, kann aber zu Glycin Betain katalysiert werden (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1996; Boch *et al.*, 1997). Die *de novo* Synthese von Glycin Betain kann über eine stufenweise Methylierung von Glycin erfolgen oder über eine Oxidation von Cholin über verschiedene Enzyme, wie bei *B. subtilis* (Lamark *et al.*, 1991; Waditee *et al.*, 2005; Burkhardt *et al.*, 2009; Quaye *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2010; Nau-Wagner *et al.*, 2012). Sofern Cholin im Außenmedium vorhanden ist, wird Cholin bei osmotischen Stress aufgenommen. Im Zytoplasma von *B. subtilis* wird Cholin über zwei Oxidationsreaktionen, an denen die Enzyme GbsB (Alkohol-Dehydrogenase) und GbsA (Glycin Betain Aldehyd-Dehydrogenase) beteiligt sind, zu Glycin Betain oxidiert (siehe Abbildung 5) (Boch *et al.*, 1996; Boch *et al.*, 1997). Als Intermediat der Oxidationsreaktion liegt Glycin Betain Aldehyd vor (Nau-Wagner *et al.*, 2012).

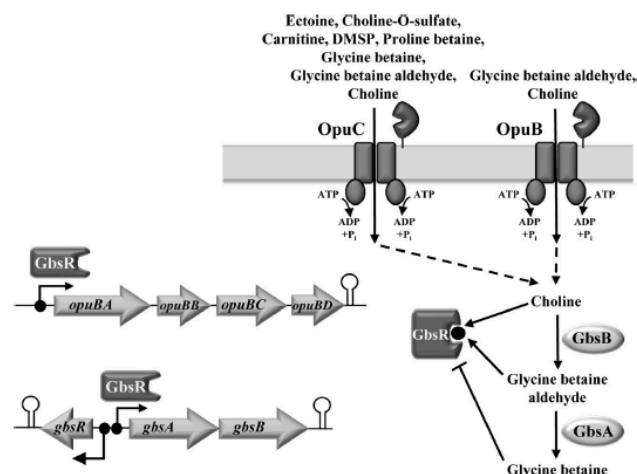


Abbildung 5: Aufnahme von Cholin und Biosynthese von Glycin Betain in *B. subtilis* unter hyperosmotischen Bedingungen. Cholin wird über die Transporter OpuB und OpuC in der Zelle akkumuliert und dort über das *gbsAB*-Operon zu Glycin Betain katalysiert. Die Aufnahme von Cholin und die Katalyse zu Glycin Betain wird über GbsR reguliert. Quelle: Nau-Wagner *et al.*, 2012.

Die Expression des *gbsAB* Operons unterliegt dem Regulator GbsR (Boch *et al.*, 1996; Nau-Wagner *et al.*, 2012). GbsR fungiert allgemein als Regulator und induziert bei Anwesenheit von Cholin im Zytoplasma die Expression des *gbsAB* Operons und des *opuB* Operons. Allerdings findet keine Induktion bei erhöhter Osmolarität statt. GbsR hat eine moderate Bindungsaffinität bei einem K_d Wert von 165 μM für Cholin (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Der Regulator induziert nicht nur die Expression der Glycin Betain Synthesegene, sondern ist auch gleichzeitig für die Repression der Gene verantwortlich. Eine Runterregulierung der Gene erfolgt nach einer ausreichenden Synthese von Glycin Betain, die benötigt wird, um den osmotischen Stress zu bewältigen (Nau-Wagner *et al.*, 2012). Die Glycin Betain Synthese kann auch in andere Organismen übertragen werden. Das *codA* Gen (kodiert für eine Cholin Oxidase) aus dem Bakterium *Arthrobacter globiformis* wurde in eine transgene Tomatenpflanze übertragen, die darauf Salztoleranter wurde (Goel *et al.*, 2011).

1.2.4 Prolinbiosynthese in *B. subtilis*

Prolin ist eine Aminosäure, die für anabole Proteinbiosynthese genutzt wird. In *B. subtilis* existiert, neben dem anabolen Prolinbiosyntheseweg, in dem Prolin ausschließlich für die Proteinbiosynthese verwendet wird, noch ein zweiter osmotisch induzierter Prolinbiosyntheseweg (siehe Abbildung 6). Durch den zweiten Prolinbiosyntheseweg ist es *B. subtilis* möglich bei osmotischen Stress hohe Konzentrationen an Prolin zu akkumulieren und als „chemisches Chaperon“ zu nutzen (Kempf and Bremer, 1998; Wood *et al.*, 2001; Fischer, 2006; Ignatova and Gierasch, 2006).

Für eine Vielzahl von Mikroorganismen, wie auch bei *B. subtilis*, ist L-Glutamat die Ausgangsaminosäure für die Prolinbiosynthese. Bei *B. subtilis* katalysieren die Enzyme γ -Glutamat Kinase (ProB, ProJ), die γ -Glutamylphosphat Reduktase (ProA) und die Δ -Pyrrolin-5-carboxylat Reduktase die Prolinbiosynthese aus Glutamat. Die anabole und die osmoadaptive Prolinbiosynthese sind durch die γ -Glutamylphosphat Reduktase (ProA) miteinander verknüpft (Brill *et al.*, 2011a).

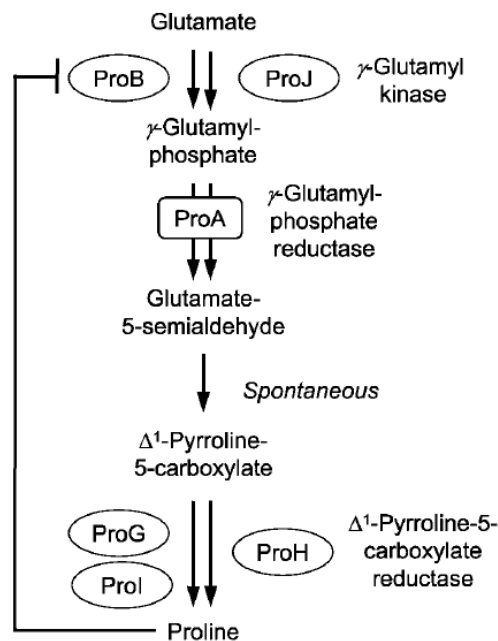


Abbildung 6: Übersicht Prolinbiosynthese in *B. subtilis*. Die Biosynthese von Prolin erfolgt ausgehend von Glutamat über drei enzymatische Reaktionen. Die anabole Prolinbiosynthese erfolgt über ProB, ProA und ProG/ProI, während die osmoprotektive Biosynthese über ProJ, ProA und ProH erfolgt. Als Intermediat bei der Reaktionen fungiert ProA. Die anabole Prolinbiosynthese wird durch eine Feedback-Hemmung und einer T-Box abhängigen Regulation des *proBA*-Operons und dem *proI*-Gen reguliert. Dagegen wird das *proHJ*-Operon ausschliesslich osmotisch reguliert. Quelle: Brill *et al.*, 2011a.

Bei der anabolen Prolinbiosynthese wird Prolin durch die Enzyme ProB, ProA und ProI katalysiert. Die Prolinbiosynthese unterliegt einer Regulation auf Proteinebene und einer weiteren transkriptionellen Regulation. Bei der Regulation auf Proteinebene wird das Enzym ProB durch eine allosterische *feedback*-Inhibition durch das Endprodukt Prolin reguliert (Chen *et al.*, 2007). Daneben wird das *proBA*-Operon und das *proI*-Gen durch eine T-Box-abhängige transkriptionelle Antitermination reguliert (Green *et al.*, 2010). Die Induktion der Gene für die drei Enzyme findet nur bei einer Limitation von Prolin in der Zelle statt (Brill *et al.*, 2011a). Durch diese beiden Regulationsmechanismen wird freies Prolin in der Zelle auf ein Basal-Level von 20 mM gehalten (Whatmore *et al.*, 1990; Zaprasis *et al.*, 2013).

Unter hohen Salzkonzentrationen ist es *B. subtilis* möglich, hohe Konzentrationen von 500 - 600 mM freien Prolin in der Zelle zu akkumulieren (Measures, 1975; Whatmore *et al.*, 1990; Brill *et al.*, 2011 a,b; Bashir *et al.*, 2014b). Die Prolinbiosynthese erfolgt über die drei Enzyme ProJ, ProA und ProH, dabei ist der gebildete Prolin Pool abhängig von der Salzkonzentration (Brill *et al.*, 2011 a; Moses *et al.*, 2012). Das *proHJ*-Operon unterliegt bei kontinuierlichen, als auch bei einem plötzlichen Anstieg der externen Salzkonzentration einer starken Expressionsinduktion (Steil *et al.*, 2003). Durch die Anwesenheit von Glycin Betain

wird die Expression des *proHJ*-Operons reprimiert und das freie Prolin wird auf das Basal-Level gedrückt (Whatmore *et al.*, 1990; Brill *et al.*, 2011 a; Bashir *et al.*, 2014b). Außerdem kann *B. subtilis* Prolin und Prolinpeptide (extern aufgenommen) als Nährstoffquelle nutzen (Moses *et al.*, 2012; Zaprasis *et al.*, 2013).

1.3 Spezifische Transportsysteme vermitteln Akkumulation kompatibler Solute unter osmotischen Bedingungen bei *B. subtilis*

Neben der endogenen *de novo* Synthese von kompatiblen Soluten nimmt *B. subtilis* bei osmotischen Stress, Kältestress und Hitzestress verschiedenste kompatible Solute durch spezifische Transporter aus der Umwelt auf (siehe Abbildung 1). Kompatible Solute aus der Umgebung werden bei *B. subtilis* über hochaffine Transportsysteme aufgenommen, die Affinitäten im niedrigen μM Bereich aufweisen (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002). Unter hyperosmotischen Bedingungen sind bei *B. subtilis* fünf osmotisch induzierbare Transporter aus drei verschiedenen Transporterfamilien für die Aufnahme der kompatiblen Solute zuständig: die ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC, der BCCT Transporter OpuD und der SSS Transporter OpuE (von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter and Bremer, 1998; Bremer, 2002; Ziegler *et al.*, 2010).

ABC Transporter sind in allen drei Domänen des Lebens vorhanden und bilden eine der Größten Proteinfamilien (Davidson *et al.*, 2008). Im menschlichen Genom wurden 48 Gene, im *E. coli* K-12 Genom zwischen 52 und 80 Gene und bei *Arabidopsis thaliana* mehr als 120 Gene für ABC Transporter identifiziert (Rea, 2007; Moussatova *et al.*, 2008). Bei Bakterien und Archaeen sind die Transporter hauptsächlich am Import essentieller Moleküle beteiligt, fungieren aber auch als Exporter. (Schmitt and Tampé, 2002; Eitinger *et al.*, 2010; Cui and Davidson, 2011). Bei Eukaryonten dienen die ABC Transporter als Importer und Exporter, die besonders in der Krebstherapie und bei Krankheiten eine bedeutende Rolle in der aktuellen Forschung einnehmen (Fletcher *et al.*, 2010; Prasad and Goffeau, 2012; Wolf *et al.*, 2012; Breier *et al.*, 2013). Allgemein besitzen ABC Transporter zwei transmembrane Domänen (TMD) und zwei zytoplasmatische Nukleotid Bindungs Domänen (NBD) (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2008; Beek *et al.*, 2014), wie in Abbildung 7 gezeigt ist. Die NBD Domänen sind charakteristisch, namensgebend und stark konserviert für ABC Transporter. Die Domäne hydrolysiert ATP in ADP (zwischen dem γ - und β -Phosphat) und liefert damit die benötigte Energie für Transport (typischerweise -50 kJ mol^{-1} in Zellen) (ter Beek *et al.*, 2014). Es sind derzeit vier Typen von ABC Transportern identifiziert worden (siehe Abbildung 7). Die Einteilung der ABC Transporter erfolgte über

die Faltung der TMD Domänen, die in ihrer sekundär Struktur eine große Varianz aufzeigen und größtenteils keine große Homologie zwischen den Transportern offenbaren (ter Beek *et al.*, 2014).

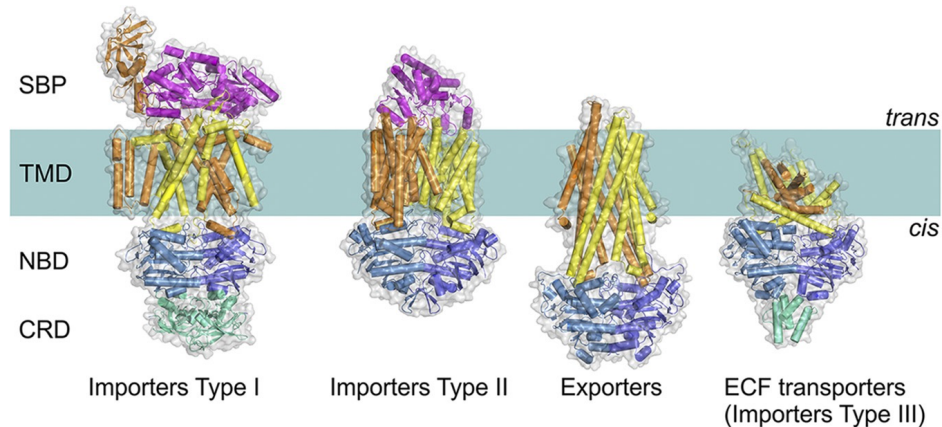


Abbildung 7: Übersicht der verschiedenen ABC Transporter. Alle ABC Transporter besitzen generelle Strukturen: Zwei NBDs (Blau) und 2 TMDs (Orange und Gelb). Zusätzliche Domänen (CRD), die oft eine regulatorische Funktion besitzen, sind in Grün gezeigt (C-terminal). Die Typ 1 und Typ 2 ABC Transporter erkennen Substrate über SBP (Magenta). Das SBP bindet die Substrate und führt sie zu den TMDs, wo die Substrate transportiert werden. Quelle: ter Beek *et al.*, 2014.

Drei Import ABC Transporter Typen (1, 2 und ECF) kommen ausschließlich in Prokaryonten vor, während Exporter in Prokaryonten, als auch in Eukaryonten vorkommen (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2008; ter Beek *et al.*, 2014). Die Importer Typ 1 und Typ 2 besitzen zusätzlich ein frei diffundierendes (gram-negative Bakterien) oder über eine Ankerstruktur an der Membran befestigtes Substratbindeproteine (SBP) (gram-positive Bakterien). Das extrazelluläre SBP ist für die Bindung der Substrate verantwortlich und koordiniert die Substrate zu den TMD Domänen (Berntsson *et al.*, 2010). Die Aufnahme wird im wesentlichen durch die Affinität des Substrates zum Substratbindeprotein bestimmt (siehe 1.3.2). Manche Transporter besitzen des weiteren eine zusätzliche regulatorische Domäne (CRD) am C-terminalen Ende (ter Beek *et al.*, 2014). Mit den ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC besitzt *B. subtilis* drei osmotisch regulierte Transporter, die bei Punkt 1.3.1 genauer beschrieben werden.

Transporter der BCCT-Familie (Betain Cholin Carnitin Transporter), wie OpuD, sind Symporter und wurden bisher nur in Mikroorganismen gefunden (Saier *et al.*, 1999; Ziegler *et al.*, 2010). Die Aufnahme der kompatiblen Solute über OpuD wird über ein Protonengradienten angetrieben und ist vom SigmaB Promotor abhängig. Neben der Aufnahme der Solute werden Na^+ -Ionen in die Zelle transportiert (Ziegler *et al.*, 2010).

Der Prolinspezifische OpuE Transporter gehört zur Familie der SSS Transporter (Sodium/Substrat Symporter), der ebenfalls Na^+ -Ionen neben Prolin transportiert (von Blohn *et al.*, 1997; Spiegelhalter and Bremer, 1998; Quentin *et al.*, 1999; Jung, 2002; Moses *et al.*, 2012).

1.3.1 Die ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC bei *B. subtilis*

Die ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC bei *B. subtilis* sind osmotisch induziert und sind für die Aufnahme der kompatiblen Solute verantwortlich (Bremer, 2002). Die Opu Transporter besitzen zwei ATPasen Bindepoteine (NBD's), zwei membrandurchspannende Transmembranproteine (TMD's) und ein Substratbindepoteine, dass durch eine Ankerstruktur N-terminal in der Membran befestigt ist (siehe 1.3.2) (Kappes *et al.*, 1999). In Abbildung 8 sind die einzelnen Komponenten und ihre Organisation im Genom abgebildet. Die Transporter OpuB und OpuC sind vermutlich aus einer Genduplikation entstanden und zeigen sehr hohe Homologien in ihren Transporterkomponenten zwischen 69 - 85 % (Kappes *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2011; Pittelkov *et al.*, 2011).

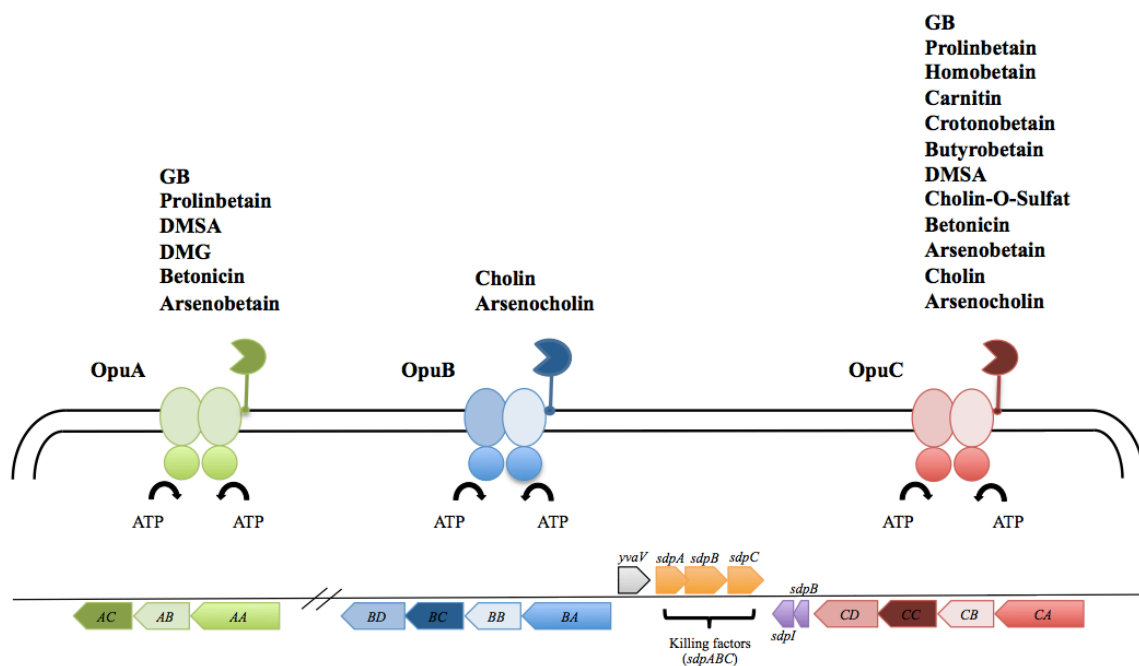


Abbildung 8: Strukturen der ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC und deren Lokalisierung im Genom von *B. subtilis*. Die ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC zeigen typische ABC Transporter Strukturen: sie besitzen zwei NBD's, zwei TMD's und ein SBP. Das *opuA* Operon besteht aus 3 Genen, während die Operone von *opuB* und *opuC* vier Gene aufzeigen. Im Genom liegen die Gene für die Transporter OpuB und OpuC in unmittelbarer Nachbarschaft, denn sie sind aus einer Gendublikation entstanden. Zwischen den Operonen der Transporter liegen bei *B. subtilis* 168 Kannibalisierungs Gene (Ellermeier *et al.*, 2006).

Alle drei Transporter nehmen kompatible Solute mit sehr hoher Effizienz auf, allerdings unterscheidet sich das Substratspektrum teils erheblich bei den Transportern. Ganz dramatisch fällt der Unterschied bei OpuB und OpuC auf. Der OpuB Transporter nimmt nur Cholin, Cholin Derivate und Glycin Betain Aldehyde auf, dagegen besitzt der OpuC Transporter mit Abstand das breiteste Substratspektrum und transportiert eine Vielzahl unterschiedlicher kompatibler Solute (siehe Abbildung 8) (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes and Bremer, 1998; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002; Hoffmann and Bremer, 2011, Bashir *et al.*, 2014a,b).

1.3.2 Die extrazellulären Substratbindepoteine von ABC Transportern

Wie im Punkt 1.3 bereits erwähnt, besitzen ABC Transporter bei Mikroorganismen, (Typ 1 und Typ 2) neben den TMD's und NBD's noch extrazelluläre Substratbindepoteine (SBP). Es können eine Vielzahl verschiedenster anorganischer oder organischer Substanzen, wie Zucker, Aminosäuren, Peptide, Vitamine, Eisenmoleküle und Polypeptide von den SBP erkannt und anschließend der Transport vermittelt werden (Berntsson *et al.*, 2010). Eine Übersicht über verschiedene extrazelluläre SBP ist in Abbildung 9 gezeigt. SBP sind nicht nur mit bakteriellen ABC Transportern assoziiert, sondern sind auch Teil von Zwei-Komponenten Systeme (Neiditch *et al.*, 2010), Peptid Rezeptoren bzw. G-Protein Rezeptoren (Felder *et al.*, 1999; Misono, 2002), Ionen Kanälen (Armstrong and Gouaux, 2000) und sind Teil von DNA-Bindeproteinen, die in der Genregulation involviert sind (Schuhmacher *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1996).

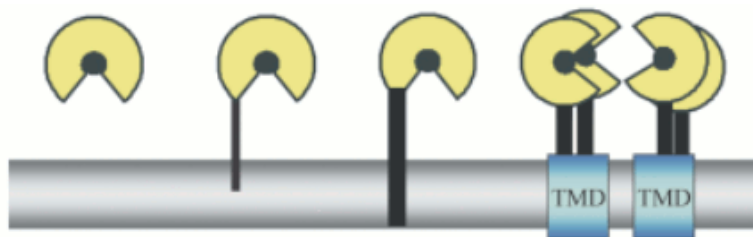


Abbildung 9: Organisation bakterieller SBP. In gram-negativen Bakterien diffundiert das extrazelluläre SBP frei im Periplasma, während das SBP bei gram-positiven und Archaeen über eine Ankerstruktur an der Membran befestigt ist. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die SBP an die TMD's fusioniert sind. Quelle: Eitinger *et al.*, 2010.

Bei gram-negativen Bakterien (wie z. B. der Maltose Transporter *E. coli*) diffundiert das extrazelluläre SBP frei zwischen der inneren und äußeren Membran im Periplasma (Oldham *et al.*, 2007; Oldham and Chen, 2011). In gram-positiven Mikroorganismen (wie z. B. *B. subtilis*) ist das extrazelluläre SBP durch ein N-terminalen Lipidanker auf der Oberfläche der

Membran fest verankert (Kappes *et al.*, 1999) bzw. bei einigen Archaen über eine N-terminalen hydrophobe Helex. Außerdem kann das SBP an die TMD Domäne fusioniert sein (van der Heide and Poolman, 2000; van der Heide and Poolman, 2002; Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). Im Allgemeinen bestehen SBP aus zwei konservierten symmetrischen α/β Helices/Faltblattstrukturen, die den Core bilden. Die beiden globalen Domänen (Domäne I und Domäne II) werden über eine Gelenkstruktur, die aus zwei Loops gebildet wird, zusammengehalten. Die Domäne I und II formen eine tiefe Spalte in der das Substrat gebunden werden kann, diese Substratbindetasche ist typisch für extrazelluläre SBP (Berntsson *et al.*, 2010). In Abwesenheit des Substrates sind die Domänen um die Gelenkstruktur herum sehr flexibel (Quioco and Ledvina, 1996; Tang *et al.*, 2007; Berntsson *et al.*, 2010). Bindet das Substrat, findet eine Konformationsänderung des Proteins statt, dadurch wird das Substrat festgehalten. Dieser Mechanismus wird als „Venus Fly-trap“ bezeichnet (Mao *et al.*, 1982; Davidson *et al.*, 2008;).

Die Aufnahme der kompatiblen Solute bei *B. subtilis* wird im hohen Maße durch die Bindungsaffinitäten der Substratbindepoteine (OpuAC, OpuBC und OpuCC) determiniert, dabei spielt eine aromatische Bindungsseite (siehe 1.3.3) und die daraus entstehenden Kationen π -Interaktionen (siehe 1.3.4) im Substratbindepotein eine entscheidende Rolle. Anhand der Bindung von Glycin Betain bei OpuAC und OpuCC bzw. Cholin bei OpuBC sollen die Bindungen in den folgenden Abschnitten veranschaulicht werden.

1.3.3 Der „aromatische Cage“ und die Bindung von kompatiblen Soluten an die extrazellulären Substratbindepoteine

Die Bindung von kompatiblen Soluten erfolgt über die hochaffinen SBP OpuAC, OpuBC und OpuCC. Anhand von Glycin Betain und Cholin sollen die Bindungen der Substrate zu den SBP im Detail dargelegt werden (siehe Abbildung 10). Die SBP der OpuA, OpuB und OpuC Transporter besitzen einen „aromatischen Cage“, der von aromatischen Aminosäuren gebildet wird. In diesem „aromatischen Cage“, das die Bindungstasche darstellt, werden die positiv geladenen Trimethylammoniumgruppen der kompatiblen Solute über Kationen π -Interaktionen und van der Waals Kräfte (siehe 1.3.4) gebunden und koordiniert. Die Schwanzgruppen (z. B. Hydroxygruppen) ragen aus diesem „aromatischen Cage“ heraus und gehen direkt mit Aminosäuren des Proteins Interaktionen ein oder werden indirekt über ausgebildete Wassernetzwerke koordiniert.

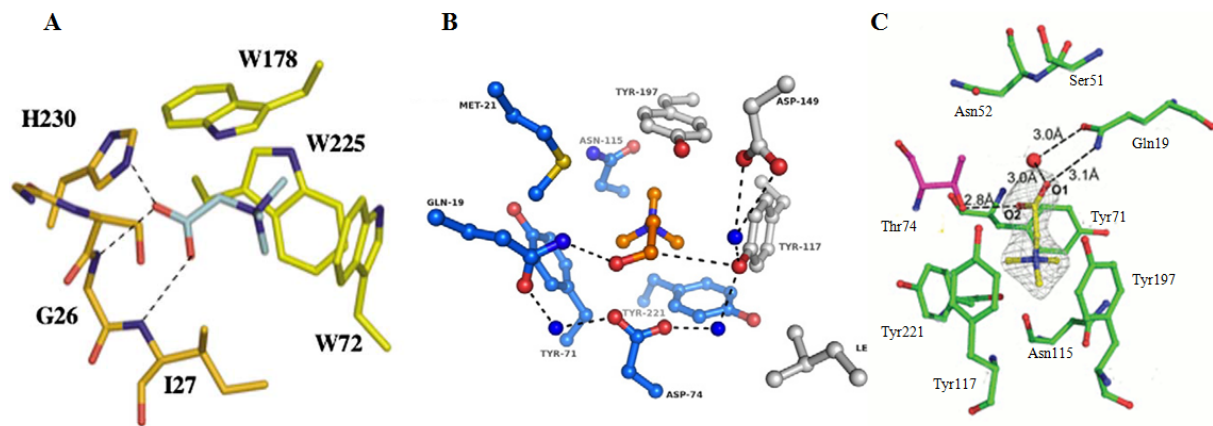


Abbildung 10: Bindungsstrukturen bei OpuAC, OpuBC und OpuCC mit Glycin Betain bzw. Cholin. Gezeigt sind die Bindungstaschen der extrazellulären SBP und die Stabilisierung des Substrates bei (A) OpuAC mit Glycin Betain, (B) OpuBC mit Cholin und (C) OpuCC mit Glycin Betain. Quelle: Horn *et al.*, 2006; Pittelkov *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011.

(A) Bei OpuAC wird die aromatische Bindungstasche aus drei Tryptophanen (Trp72, Trp178 und Trp225) gebildet, welche die positiv geladene Trimethylammoniumgruppe von Glycin Betain stabilisieren. Daneben wird die Carboxylgruppe von Glycin Betain von den Aminosäureresten Gly26 und Ile27 stabilisiert. Eine Wasserstoffbrücke von His230 zur Carboxylgruppe, die bei der Bindung zu Prolinbetain nicht ausgebildet wird, sorgt zusätzlich für eine verbesserte Stabilisierung. Die Bindungsaffinität von OpuAC zu Glycin Betain ist hochaffin. Der K_d Wert von Glycin Betain beträgt 17 μM (Horn *et al.*, 2006).

(B) Bei OpuBC wird die aromatische Bindungstasche aus vier Tyrosinen gebildet (Tyr71, Tyr117, Tyr197 und Tyr221), die die Trimethylammoniumreste von Cholin koordinieren und über Kationen π -Interaktionen stabilisieren. Zusätzlich wird die positive Kopfgruppe über ein Wasserstoff der Aminosäure Asp149 direkt stabilisiert. Die Hydroxylgruppe von Cholin wird nur über eine starke Interaktion mit Gln19 stabilisiert. Neben der Interaktion von Cholin mit dem Aminosäurerest von Gln19 findet eine Stabilisierung des Liganden über Wassermoleküle zwischen Aminosäuren der Domäne I und Domäne II statt. Dieses Wassernetzwerk wird über die Aminosäuren Asp74, Tyr117 und Leu155 ausgebildet (Pittelkov *et al.*, 2011). Die Aminosäure Leu155 (Domäne II) interagiert indirekt über zwei Wassermoleküle mit der Aminosäure Asp74 (Domäne I).

(C) Bei OpuCC bilden, wie bei OpuBC, vier Tyrosine (Tyr71, Tyr117; Tyr197 und Tyr221) den „aromatischen Cage“, wo die Trimethylammoniumgruppe von Glycin Betain über Kationen π -Interaktionen und hydrophobe Interaktionen stabilisiert wird. Die Carboxylgruppe von Glycin Betain wird über die Aminosäurereste Thr74 und Gln19 stabilisiert (Du *et al.*, 2011). Der Aminosäurerest von Thr74 scheint eine wichtige Stellung bei der Stabilisierung

von Glycin Betain einzunehmen, denn bei Cholin findet hier keine Koordination und Stabilisierung statt. Du *et al.*, 2011 konnten in Mutationsexperimenten zeigen das eine Mutation der Aminosäure Thr74 in Asp74 zu einem Verlust der Fähigkeit Glycin Betain zu binden führt.

1.3.4 Kationen π -Interaktionen in biologischen Systemen

Kationen und positive Wasserstoffatome können mit Oberflächen von unpolaren oder aromatischen Strukturen interagieren und bilden dabei Kationen π -Interaktionen aus (Ma and Dougherty, 1997; Mahadevi and Sastry, 2013; Dougherty, 2013). Diese Interaktion beruht auf einer Wechselwirkung von π -Elektronen eines aromatischen Ringes und einer positiven Ladung. Aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) können mit Kationen oder positiv geladenen Seitengruppen anderer Moleküle interagieren. Diese nicht-kovalente Bindung spielt besonders bei Wechselwirkung in biologischen Makromolekülen (z. B. bei Proteinen) eine wichtige Rolle. Kationen π -Interaktionen sind vorallem bei Molekülen mit einer Trimethylammoniumgruppe bekannt, die bei Protein-Protein Interaktionen wichtig sind (Ma and Dougherty, 1997; Dougherty, 2013; Rapp *et al.*, 2014). Cholin und Cholin Derivate, wie z. B. die quartäre Ammoniumverbindung Acetylcholin (Neurotransmitter in Nervensystemen) wird vom synaptischen Rezeptor über Interaktionen an der Ammoniumgruppen und einem „aromatischen Cage“ erkannt (Dougherty and Stauffer, 1990). Der „aromatischen Cage“ wird aus zwei bis vier aromatischen Aminosäuren geformt. Die stärke der Interaktionen ist von der aromatischen Aminosäure und von der Geometrie der Interaktionen abhängig (Mecozzi *et al.*, 1996; Rapp *et al.*, 2014). Diese aromatischen Systeme sind bei Enzymen die Histonen methylieren oder demethylieren (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002), Interaktionen peripherer Membranproteine mit Phospholipidgruppen (Cheng *et al.*, 2013), die Affinität des Xa Proteins zu methylierten Liganden (Salonen *et al.*, 2009), Neurotransmitter in Nervensystemen (Dougherty and Stauffer, 1990) und bei SBP von ABC Transportern bekannt (Berntson *et al.*, 2011).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das grampositive Bakterium *B. subtilis* lebt in vielen unterschiedlichen ökologischen Habitaten, wie z. B. in den oberen Erdbodenschichten und marinen Systemen. Die Anpassung des Bakteriums an veränderte Umweltbedingungen, insbesondere bei der Osmoregulation für die Aufrechterhaltung des zellulären Turgors in einer hyperosmotischen Umgebung, wurde in den letzten Jahren weitestgehend aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht in wie weit DMSP, ein vorallem in marinen Ökosystemen vorkommendes kompatibles Solut, von *B. subtilis* aufgenommen werden kann. Kann DMSP von *B. subtilis* unter verschiedenen Stressbedingungen aufgenommen werden um die Zelle zu schützen und dient es als Nährstoffquelle sind zentrale Fragen in dieser Arbeit. Erfolgt eine Aufnahme von DMSP sollte der zuständige Opu Transporter identifiziert werden und die kinetischen Parameter für die Aufnahme bestimmt werden. Aus marinen Mikroorganismen ist bekannt das Glycin Betain und DMSP über die selben Transportsysteme akkumuliert werden (Gouesbet *et al.*, 1994; Cosquer *et al.*, 1999; Murdock *et al.*, 2014), ist das auch bei *B. subtilis* der Fall?

Viele kompatible Solute sind chemisch sehr ähnlich. Einige der bekannten kompatiblen Solute besitzen ein positiv geladene metylierte Trimethylammoniumgruppe (Glycin Betain, Cholin und Carnitin), während DMSP eine positiv geladene Dimetylsulfan Kopfgruppe (wie DMSA) besitzt. Wie wirken sich chemische Modifizierungen der positiv geladenen Kopfgruppe auf die Erkennung der extrazellulären SBP der ABC Transporter OpuA, OpuB und OpuC zu den Substraten aus? Der OpuB Transporter, der nur Cholin akkumuliert, und OpuC Transporter, der ein breites Substratspektrum aufweist, sind nah miteinander verwandt. Die Gene der beiden Transporter liegen bei *B. subtilis* in direkter Nachbarschaft im Genom, den ein Transporter ist aus einer Genduplikation entstanden. Welcher Transporter hat sich im Zuge der Evolution neu etabliert war ebenfalls eine der Kernfragen in dieser Arbeit. Obwohl die beiden Transporter miteinander hohe Sequenzhomologien aufweisen, unterscheiden sie sich erheblich in ihrer Fähigkeit kompatible Solute zu binden und ins Zytoplasma zu transportieren. Durch welche molekularen Anpassungen wird die Substratspezifität gewährleistet und lassen sich die Substratspektren mit Mutationen in den extrazellulären SBP aufhebeln?

Für die Untersuchung dieser Fragestellungen wurden Wachstumsexperimente mit verschiedenen Stressbedingungen für die *B. subtilis* Zellen durchgeführt. Kinetische Parameter für die unterschiedlichen Transportsysteme wurden über die Aufnahme radioaktiv markierter kompatibler Solute und über Bindungsaffinitäten der extrazellulären heterolog

gereinigten SBP erhoben. In Mutationsexperimenten wurde in den extrazellulären SBP ein Aminosäureaustausch vorgenommen. Grundlage dafür welche Aminosäure ausgetauscht wurde waren bioinformatische Voruntersuchungen von Pittelkov *et al.*, 2011 und Du *et al.*, 2011. In Kristallisationsstudien sollte die Änderung des Substratspektrums durch den Aminosäureaustausch molekular nachvollzogen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), QIAGEN (Hilden, Deutschland) und Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

2.1.1 Kompatible Solute

Die kompatiblen Solute Glycin Betain, Carnitin, Cholin, DMSP, Cholin-O-Sulfat, Homobetain, Prolin Betain, Arsenocholin, Arsenobetain, Crotonobetain, γ -Butyrobetain, Ection und 5-Hydroxyectoin wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), Carbon Scientific Co, LTD (London, England), Actin Chemicals Inc. (China), Argus Chemicals srt (Vernio, Italien), LONZA Ltd (Basel, Schweiz) und Bitop (Witten, Deutschland) hergestellt.

Die Chemikalien zur Synthese der verschiedenen DMSP Derivate stammten von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Acros Organics (Therma Fisher Scientific, Geel, Belgien) und wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Jeroen S. Dickschat (Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Synthese der DMSP Derivate Dimethylseleniopropionat (DMSeP), Dimethyltelluriopropionat (DMTeP), Ethylmethylsulfoniopropionat (EMSP), Diethylsulfoniopropionat (DESP), Methylpropylsulfoniopropionat (MPSP), Isopropylmethylsulfoniopropionat (IMSP) und Tetramethylsulfoniopropionat (TMSP) erfolgte über eine Michael Addition der korrespondierenden Dialkyl Chalogenides zu Acrylic Säure (Dickschat *et al.*, 2010 und Brock *et al.*, 2014).

Das Selen Derivat DMSeP kommt natürlicherweise vor, besonders in Selen konatminierten Salzwiesen (Ansede and Yoch, 1997; Ansede *et al.*, 1999). Dagegen sind DMTeP, EMSP, DESP, MPSP, IMSP und TMSP synthetische DMSP Derivate, die nicht in der Natur zu finden sind (Dickschat *et al.*, 2010; Brock *et al.*, 2014).

2.1.2 Radioaktive kompatible Solute

Radioaktives $[1\text{-C}^{14}]$ -Glycin Betain ($55\text{mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$) wurde von der Firma American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, Mo, USA) bezogen. Radioaktives ^{14}C markiertes

Cholin (540 mCi* mmol⁻¹) und L-Carnitin (540 mCi* mmol⁻¹) stammten von der Firma DuPont NEN Products (Boston, MA, USA).

2.1.3 Antibiotika

Die Antibiotika Kanamycin, Erythromycin, Spectinomycin, Tetracyclin, Ampicilin und Gentamycin wurden von SERVA Electrophores GmbH (Heidelberg, Deutschland), United States Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.2 Bakterienstämme , Plasmide und Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden verschiedene *B. subtilis* und *E. coli* Stämme verwendet, die nachfolgend in der Tabelle 1 und Tabelle 2 mit den jeweiligen Genotypen beschrieben wurden. Die verwendeten Plasmide und Oligonukleotide in dieser Arbeit wurden in der Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst.

2.2.1 Bakterienstämme

Die *E. coli* Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in folgender Tabelle mit entsprechenden Genotypen zusammengefasst. Einige Stämme wurden von Agilent Technologies (La Jolla, USA) bezogen.

Tabelle 1: *E. coli* Stämme.

| Stamm | Beschreibung | Referenz |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| DH5α | F ⁻ ϕ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i> | Hanahan, 1983 |
| XL 10-Gold | <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 Tet ^R F'[<i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R) Amy Cm ^R] | Agilent |
| BL21 (DE3) | F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>]) | Agilent |
| Arctic Express (DE3) RIL | F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm⁺ Tet^R gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>cpn10 cpn60 Genta^R</i>] [<i>argU ileY leuW Str</i>] | Agilent |

Für die verschiedenen hergestellten *Bacillus* Stämme dienten die Wildtyp Stämme *B. subtilis* JH642 und *B. subtilis* 168 als Ausgangsstämme (Brehm *et al.*, 1973; Barbe *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2014).

Tabelle 2: *B. subtilis* Stämme.

| Stamm | Beschreibung | Referenz |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| JH642 | <i>trpC2 pheA1</i> | Brehm <i>et al.</i> , 1973 |
| SBB1 | JH642 $\Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2 \Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1$ | diese Arbeit |
| SBB2 | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2 \Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1$ | diese Arbeit |
| SBB3 | JH642 $\Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1$ | diese Arbeit |
| SBB4 | JH642 $\Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3$ | diese Arbeit |
| SBB5 | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{kan})2$ | diese Arbeit |
| SBB6 ^a | JH642 <i>amyE::pX</i> | diese Arbeit |
| SBB7 ^a | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{kan})2 \textit{amyE}::\textit{pX}$ | diese Arbeit |
| SBB8 ^a | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2 \Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1 \textit{amyE}::\textit{pX}$ | diese Arbeit |
| SBB9 ^a | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1 \Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{kan})2$ <i>amyE::opuB(D74T)</i> | diese Arbeit |
| SBB10 ^a | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1 \Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{kan})2$ <i>amyE::opuC(T74D)</i> | diese Arbeit |
| RMKB7 | JH642 $\Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$ | Kappes <i>et al.</i> , 1996 |
| TMB107 | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3$ | Broy <i>et al.</i> , 2014 |
| TMB108 | JH642 $\Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3$ | Broy <i>et al.</i> , 2014 |
| TMB109 | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$ | Broy <i>et al.</i> , 2014 |
| TMB111 | JH642 $\Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$ | Broy <i>et al.</i> , 2014 |
| TMB116 | JH642 $\Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1$ | Broy <i>et al.</i> , 2014 |
| TMB118 | JH642 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{tet})3 \Delta(\textit{opuB}::\textit{ery})1 \Delta(\textit{opuC}::\textit{spc})3 \Delta(\textit{opuD}::\textit{kan})2$ | Tamara Hoffmann |
| MBB9 ^b | JH642 <i>amyE::[Φ(<i>opuAA-treA</i>)1 cat] (<i>treA::neo</i>)</i> | Hoffmann <i>et al.</i> , 2013 |
| JSB7 ^c | (<i>treA::neo</i>)1 <i>amyE::[Φ(<i>proH'-treA</i>)1 cat]</i> | Brill <i>et al.</i> , 2011b |
| 168 | <i>trpC2</i> | Barbe <i>et al.</i> , 2009 |
| JGB23 | 168 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{erm})4 \Delta(\textit{opuB}::\textit{tet})23 \textit{opuC20}::\textit{Tn10 (spc)}$ | Hoffmann and Bremer, 2011 |
| JGB24 | 168 $\Delta(\textit{opuA}::\textit{erm})4 \Delta(\textit{opuB}::\textit{tet})23 \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$ | Hoffmann and Bremer, 2011 |
| JGB25 | 168 $\Delta(\textit{opuB}::\textit{tet})23 \textit{opuC20}::\textit{Tn10 (spc)} \Delta(\textit{opuD}::\textit{neo})2$ | Hoffmann and Bremer, 2011 |

a Das pX Plasmid (ohne und mit Insert) wurde über eine doppelte homologe Rekombination in die *amyE* Seite von *B. subtilis* als Einzelkopie integriert. Das nicht essentielle *amyE* Gen hat seine Funktion verloren Amylase abzubauen.

b Die Φ(*opuAA-treA*) Reportergenfusion wurde über eine doppelte homologe Rekombination in die *amyE* Seite von *B. subtilis* als Einzelkopie integriert. Das *treA* Gen ohne eigenen Promotor lag im *opuAA* Gen des *opuA* Operons und stand unter der transkriptionellen Kontrolle des *opuA* Promotors.

c Die Φ(*proH-treA*) Reportergenfusion wurde über eine doppelte homologe Rekombination in die *amyE* Seite von *B. subtilis* als Einzelkopie integriert. Das *treA* Gen ohne eigenen Promotor lag im *proH* Gen des *proHJ* Operons und stand unter der transkriptionellen Kontrolle des *proHJ* Promotors.

2.2.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide für die Arbeit wurden in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| pSB1 ^a | Gen <i>opuCC</i> ohne Signalsequenz in pASK-IBA3 mit C-terminalen <i>Strep-tag</i> ®; 1. AS Cys in Gly geändert; Amp ^R | diese Arbeit |
| pENTRY-IBA20 | Eintrittsvektor für Stargate® Klonierungssystem für IBA; Kan ^R | IBA (Göttingen) |
| pASK-IBA 3 ^a | <i>Strep-tag</i> ® Expressionsvektor für <i>E. coli</i> | IBA (Göttingen) |
| pMH24 ^a | Gen <i>opuAC</i> in pASK-IBA6 Vektor; Expressionsvektor | Smits <i>et al.</i> , 2008 |
| pMP31 ^a | Wildtyp Gen <i>opuBC</i> in pASK-IBA6 Vektor; Expressionsvektor | Pittelkov <i>et al.</i> , 2011 |
| pMP55 ^a | Gen <i>opuBC</i> (D74T) in pASK-IBA6 Vektor; Expressionsvektor | Marco Pittelkov |
| pX | Amp ^R und Cm ^R | Kim <i>et al.</i> , 1996 |
| pMT9 | Gesamtes OpuB Operon mit nativen Promotor im pX Plasmid | Marietta Thüring |
| pChen3 | Gesamtes OpuC Operon mit nativen Promotor im pX Plasmid | Chiliang Chen |

a Die Expressionplasmide standen unter der transkriptioneller Kontrolle durch ein *tet*-Promotor, der durch AHT induziert werden konnte.

2.2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.

| Name | Sequenz 5'-3' | Beschreibung |
|------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| opuCC-pENTRY-FW | 5'- AAGCTCTTCAATGGGCTCTCTGCCGGGTC-3' | OpuCC Gen Amplifizierung und Klonierung in pENTRY |
| opuCC-pENTRY-Rev | 5'-AAGCTGTTCACCCGTCAAATAATGATG TTTCTCTAAAA-3' | OpuCC Gen Amplifizierung und Klonierung in pENTRY |
| pASK-IBA forward | 5'-GTGAAATGAATAGTTCGAC-3' | Sequenzierung IBA Vektoren |
| pASK-IBA revers | 5'-CGCAGTAGCGGTAAACGGC-3' | Sequenzierung IBA Vektoren |
| OpuCC_T74D_fwd | 5'- CACGCGCTATTCGGAGACGATTTAAC AAGCACC-3' | Primer Mutagenese OpuCC AS Tausch T74D |
| OpuCC_T74D_rev | 5'-GGTGCTTGTTAAATCGTCTCCGGAATAG CGCGTG-3' | Primer Mutagenese OpuCC AS Tausch T74D |
| opuCCF | 5'-ATGACAAAAATCAAATGGCTTGGCG-3' | Sequenzierung von OpuCC |
| opuCCR | 5'-TTAGTCAAATAATGATGTTTCTCTAAAAA TTCCTTTGC-3' | Sequenzierung von OpuCC |

Fortsetzung Tabelle 4

| | | |
|----------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| opuCF | 5'-AGCTGATCATCCCTTCAAATGGC-3' | Sequenzierung OpuC Operon |
| OpuCseq2 | 5'-TTCAAGTCGGCACACCTGATGAGA-3' | Sequenzierung OpuC Operon |
| OpuCseq3 | 5'-TCGGCGTTGCTCTTACCAGAATGA-3' | Sequenzierung OpuC Operon |
| OpuCseq4 | 5'-CGCGTTTGCTCTCGTCTTTGTCAT-3' | Sequenzierung OpuC Operon |
| OpuCseq5 | 5'-AAGCTGATTGGGCAAATCGACACG-3' | Sequenzierung OpuC Operon |
| OpuBC_D74T_fwd | 5'-CACAAGATATACGGGAACCGCGCTGAC AGGCACG-3' | Primer Mutagenese OpuBC AS Tausch D74T |
| OpuBC_D74T_rev | 5'-CGTGCCTGTCAGCGCGGTTCCCGTATA TCTTGTG-3' | Primer Mutagenese OpuBC AS Tausch D74T |
| opuBCF | 5'-ATGAAAAGAAAATATCTCAAATTAATGAT AGGTTTAGCAC-3' | Sequenzierung von OpuBC |
| opuBCR | 5'-TCACGATTCGAAATAGCGATGTTTTT CTAAATATTCC-3' | Sequenzierung von OpuBC |
| opuBF | 5'-CGGTTTCATCCTTTTCAGCTAACAATTC-3' | Sequenzierung OpuB Operon |
| opuBseq1 | 5'-TTCAGCAGAATATCTCACTCGTCC-3' | Sequenzierung OpuB Operon |
| opuBseq2 | 5'-AAACGCTTTCTGAGGCCATTACAGC-3' | Sequenzierung OpuB Operon |
| opuBseq3 | 5'-GCGGCGGATTGGGTGATTACATTT-3' | Sequenzierung OpuB Operon |
| opuBseq4 | 5'-TGTGCTTGCGTATTCAACCGATGG-3' | Sequenzierung OpuB Operon |

2.3 Medien und Zusätze

2.3.1 Kulturmedien

B. subtilis und *E. coli* Zellen wurden routinemäßig unter aeroben Bedingungen bei 37 °C in Luria-Bertani Flüssigmedium oder auf Luria-Bertani Agar Platten (15 g/L) kultiviert (Miller, 1972). Zur Überprüfung der extrazellulären α -Amylase (AmyE) Aktivität bei *B. subtilis* dienten LB-Stärke Platten, wo die Kolonien mit einer Iod-Lösung bedeckt wurden (siehe 2.6.9) (Cutting and Horn, 1990).

Für die verschiedenen Experimente wurden *B. subtilis* Stämme im definierten Spizizen's Minimalmedium (SMM) kultiviert. Das Medium wurde mit 0.5 % Glukose als Kohlenstoffquelle (w/v) und einer Spurenelementlösung ergänzt (Harwood und Archibald, 1990). Zur Komplementierung der Wachstumsanforderungen von *B. subtilis* JH642 und *B. subtilis* 168 und deren Derivat Stämme (siehe Tabelle 2) wurden 40 mg ml⁻¹ L-Tryptophan und 36 mg ml⁻¹ L-Phenylalanin dem SMM hinzugefügt. Die Osmolarität des SMM wurde mit der Zugabe einer 5 M NaCl Stocklösung auf die gewünschte Endosmolarität erhöht (siehe einzelne Experimente). Kompatible Solute wurden steril filtriert und dem SMM mit einer Endkonzentration von 25 μ M bis 1 mM hinzugefügt.

E. coli Zellen wurden für die heterologe Proteinexpression in modifizierten MMA Medium mit 0.5 % Glukose (w/v) als Kohlenstoffquelle, 0.2 % Casaminosäure, 1 mM MgSO₄ und 1 mg L⁻¹ Thiamin kultiviert.

Tabelle 5: Komponenten der Medien für *B. subtilis* und *E. coli*.

| Medium | Substanzen |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB Vollmedium (1 L) | 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad dH ₂ O zu 1 L |
| SMM Medium | 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 14g K ₂ HPO ₄ 6 g KH ₂ PO ₄ 1 g Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O 0.2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O ad dH ₂ O zu 475 ml |
| Spurenelementlösung (100 x) | 0.55 g CaCl ₂ 1.35 g FeCl ₂ x 6 H ₂ O 0.1 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O 0.17 g ZnCl ₂ 0.05 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0.06 g CoCl ₂ x 6 H ₂ O 0.06 g Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O ad dH ₂ O zu 1 L |
| Minimalmedium A (MMA) | 10.5 g Na ₂ HPO ₄ 4.5 g KH ₂ PO ₄ 1 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5 g Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O ad dH ₂ O zu 1 L |

2.3.2 Zusätze in den Kulturmedien

Antibiotika, die als Zusätze zu den Medien hinzugegeben wurden, wurden in dH₂O oder Ethanol (Chloramphenicol, Tetracyclin) gelöst und steril filtriert. Die Konzentration der Stammlösungen und der Endkonzentration der Zusätze sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6: Antibiotika und Zusätze.

| Substanz (Stock) | Endkonzentration (<i>E. coli</i>) | Endkonzentration (<i>B. subtilis</i>) |
|-----------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Ampicillin (100 mg/ml) | 100 µg/ml | - |
| Chloramphenicol (30 mg/ml) | 30 µg/ml | 5 µg/ml |
| Erythromycin (4 mg/ml) | 150 µg/ml | 0.4 µg/ml |
| Kanamycin (50 mg/ml) | 50 µg/ml | 5 µg/ml |
| Spectinomycin (50 mg/ml) | 50 µg/ml | 100 µg/ml |
| Tetracyclin (5 mg/ml) | 5 µg/ml | 15 µg/ml |
| AHT (2 mg/ml) | 0.2 µg/ml | - |

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Sterilisation

Hergestellte hitzeunempfindliche Medien wurden für mindestens 60 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Medien wurden sterilfiltriert. Die verschiedenen verwendeten Glaswaren wurden für mindestens 3 Stunden bei 180 °C sterilisiert.

2.4.2 Wachstumsbedingungen und Vermehrung von Mikroorganismen

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in 5 ml Kulturen im Reagenzglas auf einem Roller oder in 20 ml Kulturen in 100 ml Erlenmyerkolben im Wasserbad bei 220 rpm bzw. auf Agar Platten im Inkubationsschrank.

Zur Kultivierung von *B. subtilis* wurde zunächst eine Einzelkolonie einer LB Platte in 5 ml LB Medium beimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Bakterien der LB Tageskultur wurden in eine weitere 20 ml SMM Kultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden die 20 ml SMM Hauptkulturen, für die verschiedenen Experimente, auf eine OD₅₇₈ von 0.1 angeimpft. Es wurde darauf geachtet das SMM Vorkulturen genommen wurden die OD₅₇₈ 1 hatten. Die Osmolarität der Hauptkultur wurde soweit eingestellt, dass nach dem Inokulieren aus der Vorkultur, die gewünschte NaCl Endkonzentration erreicht wurde.

Für Kältestress Experimente wurde *B. subtilis* 168 und dessen Derivate wie beschrieben kultiviert und bei 13 °C im Wasserbad mit 220 rpm geschüttelt und für mehrere Tage kultiviert. *B. subtilis* JH642 besitzt eine Mutation im *ilvB* Gen, was ein kältesensitiven Phänotyp zur Folge hat (Wiegeshoff and Marahiel, 2007). Aus diesen Gründen wurde für Kältestress Experimente *B. subtilis* 168 und seine Derivate verwendet, die diese Mutation nicht tragen.

Für Hitzestressexperimente wurden die 20 ml SMM Hauptkulturen bei 37 °C ins Wasserbad gestellt (220 rpm) und die Temperatur wurde langsam auf 52 °C erhöht (Holtmann and Bremer, 2004). Temperaturen wurden mit einem geeichten elektronischen Thermometer (Testo AG, Lenzkirch, Deutschland) kontrolliert.

Zur Überprüfung ob DMSP eine Kohlenstoffquelle für *B. subtilis* darstellt wurde Glukose (28 mM) im SMM durch 33 mM DMSP ersetzt. Für die Kontrolle ob DMSP als Schwefelquelle für *B. subtilis* genutzt werden kann wurde im SMM (NH₄)₂SO₄ (15mM) und MgSO₄ (200 µM) durch 15 mM DMSP und 200 µM MgCl₂ ersetzt.

2.4.3 Spektroskopischer Ermittlung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte für *B. subtilis* und *E. coli* Kulturen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm. Bei einer OD₅₇₈ von 1 wurde angenommen, das in 1 ml Kultur ca. $1 \cdot 10^9$ Zellen vorhanden waren.

2.4.4 Transport Assays mit ¹⁴C markierten kompatiblen Soluten

B. subtilis Stämme wurden für Transport Studien in 20 ml SMM mit 0.4 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ 0.3 kultiviert. 2 ml Aliquotes wurden von den Kulturen abgenommen und für den Transport Versuch mit radioaktiven ¹⁴C-markierten Glycin Betain (55mCi* mmol⁻¹), Cholin (540 mCi* mmol⁻¹) und L-Carnitin (540 mCi* mmol⁻¹) eingesetzt. Die Endkonzentration der Substrate in den Versuchen lag zwischen 3 µM und 20.000 µM. Nicht radioaktive kompatible Solute wurden als Inhibitoren für den Transport in einer Konzentration 150 µM - 1000 µM

eingesetzt (kompetitive Inhibition). Die Durchführung der Transport Experimente und Präparation der Proben für den Countner wurden ausführlich bei Kappes *et al.*, 1996 beschrieben. Die kinetischen Parameter der Transport Experimente wurden in mit der Software GraphPad Prism 5 über einen Fit bestimmt (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

2.5 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.5.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.5.1.1 Präparation chromosomaler DNA von *B. subtilis*

Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* Zellen erfolgte aus 5 ml LB Kulturen, die maximal 5 Stunden bei 37 °C auf einem Roller inkubiert wurden, nach der Vorschrift von Marmur, 1961. Die genomische DNA wurde in 0.1 bis 0.5 ml in dH₂O aufgenommen und bei 4 °C aufgehoben.

2.5.1.2 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem Kit „High Pure PCR Purification Kit“ nach dem Protokoll des Herstellers (Roche, Mannheim, Deutschland). Die Fragmente wurden in 50 µl dH₂O aufgenommen.

2.5.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte aus 5 ml LB Kulturen mit dem Kit „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ nach dem Protokoll des Herstellers (Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland). Für höhere Plasmid-DNA Präparationen erfolgte die Präparation über QIAGEN-Säulen mit dem Medi Kit des Herstellers QIAGEN (Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.5.1.4 Reinigung von DNA (Ethanol-Fällung)

Für die Reinigung von DNA wurde eine Ethanol-Fällung nach folgendem Protokoll durchgeführt.

- 1/10 Volumenanteile 3M NaAcetat (pH 4.8 – 5.2) zur Probe geben
- 2.5 Volumenanteile kaltes Ethanol (100 %) zur Probe geben
- Probe invertieren und über Nacht bei -20 °C lagern
- Probe für 60 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugieren und Pellet mit 70 % Ethanol waschen

- Probe für 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugieren, Pellet trocknen und in dH₂O resuspendieren

2.5.2 PCR zur DNA Amplifikation

Die Amplifikation von DNA erfolgte über eine PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) im PCR-Cycler Advanced Primus25 (PeqLab, Erlangen, Deutschland). Als Polymerase für die verschiedenen PCRs wurde das Enzym Phusion der Firma Finnzyme (Espoo, Finnland) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in 50 µl angesetzt und die Thermoprofile wurden entsprechend den Herstellerangaben angepasst. Welche Primer für die PCR verwendet wurden sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

2.5.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte über eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines Nanodrops (Nanodrop® ND-10.000, PeqLab, Erlangen, Deutschland). Es wird dabei angenommen, dass bei einer OD 1 bei 260 nm ungefähr 50 µg/ml doppelsträngige DNA vorliegt (37 µg/ml einzelsträngige DNA).

2.5.4 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde mit dem Kit „QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Agilent Technologies (La Jolla, USA) durchgeführt und diente dem gezielten Basenaustausch im *opuBC* und *opuCC* Gen. Es wurden modifizierte Primer verwendet (siehe Tabelle 4), die die veränderte DNA-Sequenz enthielten und dadurch gezielt Punktmutationen in den *opuBC* und *opuCC* Genen eingefügt werden konnten. Ausgangsplasmide für die Mutagenese waren pMP9 (für *opuBC*) und pChen3 (für *opuCC*). Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die Plasmide in chemisch kompetente XL-10 Gold *E. coli* Zellen (Agilent Technologies, La Jolla, USA) transformiert (siehe 2.5.9) und die gewünschte Mutation der Plasmide über Sequenzierung überprüft (siehe 2.5.5). Darauf folgte eine Transformation der Plasmide in den *B. subtilis* Stamm TMB118 (siehe 2.5.9), wo durch doppelte homologe Rekombination sich das *opuB* Operon und das *opuC* Operon stabil ins Genom integriert haben (im *amyE* Genlocus). Die korrekte Integration in den *amyE* Genlocus wurde durch ein Amylase-Test überprüft (siehe 2.6.9). Die daraus resultierenden *B. subtilis* Stämme SBB9 und SBB10 wurden für Stressprotektionsexperimente (siehe 2.4.2) und Transport Studien (siehe 2.4.4) verwendet.

2.5.5 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG (DNA Sequenzierung Service, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Mit der DNA-Sequenzierung wurden Klonierungen und die zielgerichtete Mutagenese überprüft. Dazu wurden die sequenzierten Sequenzen mit dem Programm Ape-A plasmid Editor v2.0.45 überprüft. Für die Kontrolle des gesamten Operons von *opuB* und *opuC* wurden mehrerer Primer benötigt (siehe Tabelle 4).

2.5.6 Konstruktion von *B. subtilis* Stämmen mit Defekten in ihren Opu Transportsystemen

B. subtilis besitzt für die Aufnahme von kompatiblen Soluten fünf Opu Transporter, die unter verschiedensten Stressbedingungen exprimiert werden (Bremer, 2002). Für die Analyse welche kompatiblen Solute durch welche Transporter aufgenommen werden, wurden *B. subtilis* Stämme mit Mutationen in ihren jeweiligen Opu Transportern (OpuA, OpuB, OpuC und OpuD) hergestellt (siehe Tabelle 2). Die Konstruktion der Mutationsstämmen im JH642 Hintergrund sind ausführlich bei Broy *et al.*, 2014 beschrieben. Für Kältestressexperimente wurden *B. subtilis* 168 Derivate benutzt, die Konstruktion der Derivate mit Deletionen in ihren Opu Transportsystemen ist ausführlich bei Hoffmann and Bremer, 2011 beschrieben.

2.5.7 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1 %iges Agarosegel in TAE-Laufpuffer (40 mM Tris-Cl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verwendet. Das Gel wurde bei 90 Volt für 90 Minuten laufen gelassen, anschließend in eine Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 15 Minuten gefärbt und unter UV-Licht (Wellenlänge von 302 nm) betrachtet bzw. fotografiert (Video Dokumentationsanlage, INTAS, Göttingen, Deutschland). Als Größenstandart wurde der Marker MassRuler™ DNA Ladder Mix von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

2.5.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung chemisch kompetenter DH5α, BL21 (DE3) und Arctic Express (DE3) RIL *E. coli* Zellen wurde die CaCl₂-Methode angewendet (Sambrook und Russel, 2001). Eine über Nacht gewachsene 20 ml LB Kultur wurde auf eine OD₅₇₈ von 0.1 in neues LB Medium angeimpft und bei 37 °C bei 220 rpm im Wasserbad bis zu einer OD₅₇₈ von 0.4 - 0.5 inkubiert. Die Zellen wurden in Falcontubes überführt und für 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Kultur wurde bei 4 °C bei 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend das Pellet in einer eiskalten 1 M CaCl₂ Lösung resuspendiert. Zuletzt folgte

eine erneute Zentrifugation bei 4 °C bei 5000 rpm für 15 Minuten. Die Zellen wurden in 100 µl bis 200 µl Fraktionen mit 100 mM CaCl₂ mit 15 % Glycerin resuspendiert und mit flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Aliquotes wurden bei -80 °C aufbewahrt oder direkt verwendet.

2.5.9 Transformation von *B. subtilis* und *E. coli*

2.5.9.1 Transformation von *B. subtilis*

B. subtilis besitzt beim Eintritt in die stationäre Phase eine natürliche Kompetenz, die es *B. subtilis* erlaubt freie DNA aufzunehmen (Dubnau, 1991). Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Klein *et al.*, 1992 in 20 ml modifizierten LS-Medium (2 ml 5X SMM, 5 mg ml⁻¹ L-Tryptophan, 3 mg ml⁻¹ L-Phenylalanin, 2 % Casaminoäure (w/v), 10 % Hefeextrakt (w/v), 50 mM Spermin und 1 M MgCl₂) bei 30 °C und 100 rpm im Wasserbad für 3 Stunden. Anschließend wurden 1 ml vom LS-Medium in sterile Eppendorf Cupes überführt und bei 37 °C bei 500 rpm für 2 Stunden im Thermoschüttler weiter inkubiert, bevor auf LB Agarplatten, die mit entsprechenden Antibiotika versetzt worden sind, nach Transformanten selektioniert wurde. Die für die Transformation eingesetzte DNA Menge betrug zwischen 0.1 und 3 µg.

2.5.9.2 Transformation von *E. coli*

Aliquotes der chemisch Kompetenten DH5α, BL21(DE3) und Arctic Express (DE3) RIL *E. coli* Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis aufgetaut und vorsichtig Plasmid DNA hinzugegeben. Der Transformationsansatz wurde für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte bei 42 °C für 45 Sekunden ein Hitzeschock. Die Zellen wurden daraufhin 2 Minuten auf Eis inkubiert und zum Transformationsansatz wurden 600 µL LB Medium hinzugegeben und bei 37 °C mit 500 rpm für 45 Minuten im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden Transformanten über LB Agarplatten, die mit entsprechenden Antibiotika versetzt worden sind, selektioniert.

Die Transformation von Plasmid DNA in XL-10 Gold *E. coli* Zellen erfolgte noch dem Protokoll des Herstellers (Agilent Technologies, La Jolla, USA).

2.5.10 Konstruktion von Überexpressionssystemen für das Stargate® Klonierungssystem von IBA

Für die Konstruktion von Expressionsvektoren für die herterologe Überexpression des OpuCC Substratbindeproteins von *B. subtilis* 168 wurde das Stargate® Klonierungssystem der Firma IBA (Göttingen, Deutschland) benutzt. Das *opuCC* Gen aus *B. subtilis* 168 wurde

mittels PCR amplifiziert (siehe 2.5.2), dabei wurde das Segment für die Signalsequenz entfernt und die erste Aminosäure des reifen OpuCC Proteins an dem der Lipidanker befestigt ist von einem Cystein in ein Glycin verändert. Das resultierende 892 bp lange Fragment wurde über *LguI* Schnittstellen in den pEntry Vektor kloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert (siehe 2.5.9). Der pEntry Vektor trug ein α -Fragment der β -Galatosidase, dadurch war ein Blau Weiß Screening auf LB Platten mit X-Gal möglich. Positive Klone wurden über zwei Selektionsausstriche gereinigt und der pEntry Vektor aus *E. coli* DH5 α präpariert (siehe 2.5.1.3). Der Zielvektor des amplifizierten Gens war der pASK-IBA3 Vektor (siehe Abbildung 11). Dazu wurde der pEntry Vektor mit dem gewünschten Gen zusammen in einen Ansatz mit dem pASK-IBA3 Vektor mit dem Restriktionsenzym *Esp3I* geschnitten und mit einer T4-Ligase ligiert (kombinatorisches Klonierungssystem). Das entstandene Plasmid wurde in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert und positive Klone wurden über zwei Selektionsausstriche (LB Platten mit X-Gal und 100 μ g/ml Ampicillin) gereinigt. Das resultierende pASK-IBA3 Derivat Plasmid pSB1 (siehe Tabelle 3) wurde dann für die heterologe Proteinüberexpression eingesetzt (siehe 2.6.3).

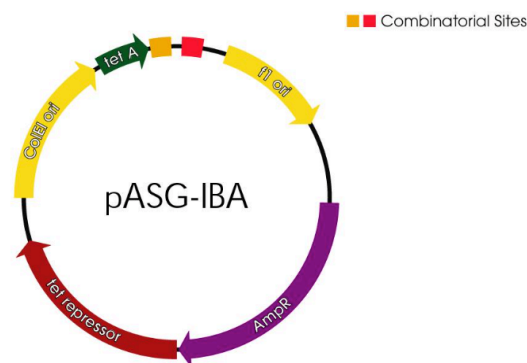


Abbildung 11: Plasmidkarte des pASK-IBA3 Vektors.

Für die Substratbindepoteine OpuAC und OpuBC lagen bereits Überexpressions Vektoren (Derivate des pASK-IBA6 Vektors) aus anderen Arbeiten vor (siehe Tabelle 3).

2.5.11 Bioinformatische Analysen

Für die Analyse von Proteinsquenzen wurde ein BLAST-P Algorithmus in den Datenbanken Integrated Microbial Genomes and Metagenomes Datenbank (IMG, www.img.jgi.doe.gov) und der National Center for Biotechnology Information Datenbank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Die gefundenen Sequenzen wurden mit CLUSTER Omega (www.ebi.ac.uk) alignnt und ausgewertet. Stammbäume der OpuBC und OpuCC Proteine wurden mit iTol (www.itol.embl.de) visualisiert.

Für die Berechnung des 16s rRNA Stammbaumes der Gattung *Bacillus* wurden 16s rRNA Sequenzen der *Bacillus* Stämme aus der Datenbank SILVA High Quality Ribosomal RNA Database (www.arb-silva.de) entnommen (Ludwig *et al.*, 2004). Alle Lücken in den 16s rRNA Sequenzen wurden entfernt und mit der Software MrBayes v3.1.2 (www.mrbayes.sourceforge.net) mit den Parametern (4by4/GTR nucleotide substitution model with 8 gamma distributed rates for 4 mio generations) bearbeitet. Der Stammbaum wurde mit Figtree v1.4.2 (www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) visualisiert. Die Berechnung des Stammbaumes wurde von Herrn Prof. Dr. Stefan Rensing (Fachbereich Biologie, Zellbiologie II, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

Für die graphische Dartsellung von Proteinstrukturen wurde routinemäßig die Software PYMOL (www.pymol.org) verwendet.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Reinheit, der molekularen Masse gereinigter Proteine und für den Western Blot (siehe 2.6.8) wurde eine SDS-Page durchgeführt (Laemmli, 1970). Dafür wurden 12 bis 15 %ige Mini SDS-Gele (8.0 x 6.0 x 0.1 cm³) in Gelapparaturen der Firma Biorad (München, Deutschland) verwendet, die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 7 beschrieben. Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer (62.5 mM Tris/HCL pH 6.8, 4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 17.4 % (w/v) Glycerin und 0.002 % (w/w) Bromphenolblau) resuspendiert, bei 95 °C erfolgte eine Denaturierung der Proteine für 10 Minuten im Thermocycler. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und auf die SDS-Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Tris/HCL Elektrodenpuffer (25 mM Tris/HCL pH 8.8, 192 mM Glycin und 0.1 % (w/v) SDS) bei einer Spannung von 20 - 35 mA. Als Marker für die Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein Page Ruler Prestained Protein Marker (Fermenta Life Science, St. Leon-Roth, Deutschland) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde ein Western Blot durchgeführt (siehe 2.6.8) oder die SDS-Gele wurden für 45 Minuten gefärbt (Färbelösung aus 0.25 % CoomassiiTM Brilliant Blue G250, 50 % (v/v) Isopropanol und 5 % (v/v) Essigsäure). Eine Entfärbung der SDS-Gele erfolgte auf einem Schüttler im Entfärber (50 % (w/v) Isopropanol, 5 % Eisessig und 45 % dH₂O).

Tabelle 7: Zusammensetzung für ein 15 %iges SDS-Gel.

| Lösung | Trenngel | Sammelgel |
|------------------------------------|-----------------|------------------|
| 1,5 M Tris/HCl pH 8.8; 13.8 mM SDS | 2.5 ml | |
| 0,5 M Tris/HCl pH 6.8; 13.8 mM SDS | | 2.5 ml |
| Acrylamid:Bisacrylamid (40 %) | 3.75 ml | 0.825 ml |
| dH ₂ O | 3.75 ml | 6,675 ml |
| TEMED | 20 µL | 20 µl |
| APS (10 %ig) | 40 µl | 40 µl |

2.6.2 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von einzelnen gereinigten Proteinen erfolgte über eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Hilfe eines Nanodrops (Nanodrop® ND-10.000, PeqLab, Erlangen, Deutschland). Über die bekannte Molekularemasse des Proteins und über seine Aminosäuresequenz kann der molekulare Extinktionskoeffizient des Proteins bestimmt werden, mit dessen Hilfe über eine Absorptionsmessung die Proteinkonzentration bestimmt werden kann.

2.6.3 Heterologe Proteinexpression von Substratbindeproteinen von *B. subtilis* in *E. coli*

Für die heterologe Proteinüberexpression verschiedener Opu Substratbindeproteine wurden entsprechende *E. coli* Expressionstämme (siehe Tabelle 1) verwendet. Die Expressionsplasmide (siehe Tabelle 3) wurden in die *E. coli* Stämme transformiert und auf LB Platten mit Antibiotikum (Ampecillin 100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde für eine über Nacht Kultur in 200 ml MMA angeimpft (siehe 2.3.1) und bei 37 °C geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurde eine 1 L MMA Hauptkultur mit OD₅₇₈ 0.1 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ 0.7 kultiviert. Für die Induktion der Proteinüberexpression wurde 100 µl AHT (2 mg/ml) in das Medium gegeben, denn die Überexpressionsplasmide besaßen ein AHT induzierbaren *tet*-Promotor. Die induzierten Kulturen wurden entweder für 16 Stunden bei 18 °C (*E. coli* Arctic Express) oder für 2 Stunden bei 37 °C (*E. coli* BL21) weiter geschüttelt und anschließend pelletiert und bei -20 °C gelagert. Die Proteinüberexpression wurde mit einer SDS-Page kontrolliert (siehe 2.6.1).

2.6.4 Reinigung der Opu Substratbindeproteine von *B. subtilis* mittels Affinitätschromatographie und Ionenaustausch

Nach einer heterologen Proteinüberexpression der Opu Substratbindeproteine wurden die Kulturen pelletiert und bei -20 °C weggefroren (siehe 2.6.3). Die Proteinpellets wurden in 20 ml Laufpuffer (100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) resuspendiert, worauf ein Zellaufschluss durch eine viermalige Passage durch eine French Press Zelle (4 °C) bei einem Druck von 1000 PSI folgte. Für die Entfernung von Zelltrümmern folgte anschließend eine Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (60 Minuten, 35.000 rpm, 4 °C).

Alle verwendeten Expressionsplasmide enthielten ein *Strep-tagII*TM und konnten daher über eine *Strep-Tactin*[®]-Sephrose Säule mittels Affinitätschromatographie (ÄKTAbasic, GE Healthcare, München, Deutschland) gereinigt werden. Die Reinigungssäule wurde mit 5 Säulenvolumen equilibriert und über ein Loop mit dem Proteinextrakt beladen. Die Säule wurde mit dem Laufpuffer gewaschen (10 bis 12 Säulenvolumen), das diente der Entfernung aller Proteine die nicht an die Säulenmatrix gebunden sind. Damit gebundene Proteine von der Säulenmatrix eluiert werden konnten, wurde die Säule mit dem Elutionspuffer (100mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM Destiobiotin) gewaschen und die eluierten Proteine in 3 ml Fraktionen aufgefangen. Für die Regeneration der *Strep-Tactin*[®]-Sephrose[®] Säule wurde die Säule mit Regenerationspuffer (100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM HABA) gewaschen.

Die gereinigten Proteine wurden Ankonzentriert und um gepuffert (siehe 2.6.5). Das OpuCC Protein wurde direkt für Fluoreszenzspektroskopische Experimente eingesetzt (siehe 2.6.6), während das OpuAC und OpuBC noch zusätzlich über Nacht mit Factor XA (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) in der Konzentration 1 mg/ml Units pro 50 µg Protein für 16 Stunden bei Raumtemperatur geschnitten wurden. Diese beiden Vektoren besitzen eine OmpA-Signalpeptidsequenz die zusammen mit dem *Strep-tagII*TM abgeschnitten wurde.

Dieses Protein/Protease/Peptide Gemisch wurde am nachfolgenden Tag mittels eines Ionenaustauschers getrennt. Dafür wurde eine mit Chromatographiepuffer (25 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl) equilibrierte 5 ml HiTrapQ-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) mit dem Gemisch über ein 2 ml Loop beladen und mit dem Chromatographiepuffer gewaschen. Über einen Salzgradienten von 25 mM – 1 M NaCl wurden das rekombinante Protein von der Protease getrennt und in 3 ml Fraktionen eluiert. Das OpuBC Protein wurde Ankonzentriert (siehe 2.6.5) und für Fluoreszenzspektroskopische Experimente bzw. für die Kristallisation (siehe 2.6.7) eingesetzt. Für das OpuAC Proteine folgte eine Dialyse, die

ausführlich in Smits *et al.*, 2008 und Bashir *et al.*, 2014a beschrieben wurde, bevor das gereinigte Protein für Fluoreszenzspektroskopische Experimente eingesetzt wurde.

2.6.5 Ankonzentration gereinigter Proteine

Für die Ankonzentrierung von Proteinlösungen wurden Vivaspin 6 ml Ankonzentrierer (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa der Firma VivaScience (Hannover, Deutschland) unter Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Ankonzentrierung der Proteine erfolgte ein Pufferaustausch.

2.6.6 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Bindungsaffinitäten der extrazellulären Substratbindeproteine von *B. subtilis*

Die kinetischen Parameter der Bindungsaffinitäten (K_d) von OpuAC, OpuBC, OpuCC und deren Derivaten zu verschiedenen kompatiblen Soluten wurde über eine intrinsische Tryptophan/Tyrosinfluoreszenz Spektroskopie bestimmt (Horn *et al.*, 2006, Smits *et al.*, 2008, Pittelkow *et al.*, 2011). Die Messung der Fluoreszenz (Emissionsspektrum von 300 – 400 nm) wurde im Fluoreszenzphotometer (Cary Eclipse, VARIAN, Palo Alto, CA, USA) durchgeführt. Die Spaltweite zum Austritt des Lichtes für die Anregung der Proteine (Endkonzentration 1 μ M Protein für den Assay) betrug 10 mm. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y), die den „aromatischen Cage“ bilden wo die Kopfgruppen der Substrate gebunden werden, sind bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt. Der aromatische Ring der Aminosäuren besitzt delokalisierte π -Elektronen, die sehr stark ultraviolettes Licht absorbieren. Eine Bindung des Substrates konnte daher über eine Änderung des Emissionsspektrums detektiert werden. Dazu wurden zum Protein unterschiedliche Konzentrationen von kompatiblen Soluten hinzu titriert. Nach einer Minute Inkubationszeit wurde das Emissionsspektrum detektiert. Über ein Vergleich der Emissionsspektren des Proteins ohne bzw. mit Substrat konnte eine Änderung der Emissionswellenlänge (OpuAC mit Glycin Betain) oder eine Änderung der Fluoreszenzintensität (OpuAC mit DMSP, OpuBC und OpuCC mit allen Substraten) über ein automatischen Peak Search detektiert werden. Die Verschiebungen der Emissionswellenlänge und der Fluoreszenzintensität erfolgten nach folgenden Gesetzmäßigkeiten für eine Sättigungskurve.

Emissionswellenlänge: $F = F_0 + (\Delta F * (S_0)/((S_0) + K_d))$
 F = Fluorezenzintensität der eingesetzten Substratkonzentration
 F_0 = Fluorezenzintensität ohne Substrat
 ΔF = Änderung der Fluorezenzintensität
 S_0 = Eingesetzte Substratkonzentration
 K_D = Bindungskonstante

Fluoreszenzintensität: $\lambda_{em,max} = \lambda_{em,max0} + (\Delta\lambda_{em,max} * (S_0)/((S_0) + K_d))$
 $\lambda_{em,max}$ = Emissionswellenlänge vom Intensitätsmaximum mit Substrat
 $\lambda_{em,max0}$ = Emissionswellenlänge vom Intensitätsmaximum ohne Substrat

Die Bindungsaffinitäten wurden über ein Fit mit der Software GraphPad Prism 5 ermittelt (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

2.6.7 Kristallisation von Proteinen

Für Kristallisationsstudien wurde die OpuBC Mutante (D74T) verwendet. Das Plasmid mit der Mutation im OpuBC Protein (pMP55) wurde bereits konstruiert und von Herrn Marco Pittelkov zur Verfügung gestellt. Die Produktion und Reinigung des Proteins für die Kristallisation erfolgte wie bei 2.6.3 und 2.6.4 beschrieben. Die Kristallisation und Auflösung der Struktur mit den Substraten Glycin Betain, Cholin, Carnitin, DMSP und Cholin-O-Sulfat wurde von Herrn Sander Smits (Institut für Biochemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt und erfolgten nach den gleichen Bedingungen wie bei Pittelkov *et al.*, 2011 beschrieben. Die aufgelösten Strukturen mit den jeweiligen Substraten wurden mit der Software PyMOL bearbeitet und dargestellt.

2.6.8 Western Blot und Immundetektion

Der Western Blot diente für den Nachweis, dass die korrekten Substratbindepoteine in den *B. subtilis* Mutanten Stämmen SBB9 (OpuBC⁺) und SBB10 (OpuCC⁺) vorhanden waren und dass sie stabil vorliegen und exprimiert werden. Die *B. subtilis* Stämme SBB6, SBB7, SBB8, SBB9 und SBB10 (siehe Tabelle1) wurden auf LB Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine Einzellkolonie wurde im 5 ml LB Medium angeimpft und im Roller bei 37 °C inkubiert. Aus der LB Tageskultur wurde eine 20 ml SMM Kultur angeimpft, die bei

37 °C im Wasserbad geschüttelt wurde. Am nächsten Morgen wurde eine 20 ml SMM Kultur auf OD₅₇₈ 0.1 von der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ 0.5 kultiviert. Anschließend erfolgte ein Salzschock auf eine Salzkonzentration im Medium von 0.4 M NaCl mit 4M NaCl SMM. Nach 60 Minuten wurden 1 ml Aliquotes der *B. subtilis* Stämme abgenommen, zentrifugiert (15 Minuten, 13.000 rpm, 4 °C) und die Zellpellets bei -20 °C aufbewahrt.

Die Zellpellets wurden in TE Puffer resuspendiert (Formel : $x \text{ (ml)} = \text{gerntete ml} * \text{OD}_{578} / 25 * 0.75$) und mit SDS-Probenpuffer (62.5 mM Tris/HCL pH 6.8, 4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 17.4 % (w/v) Glycerin und 0.002 % (w/w) Bromphenolblau) beladen. Die Proteinproben wurden für 10 Minuten bei 95 °C im Thermocycler gekocht und für 10 Minuten bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ein 12.5 %iges SDS-Gel wurde mit 10 µl der Probe beladen und die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt (siehe 2.6.1) und anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Nylon Transfer Membran (Schleich & Schuell BioScience, Keene, USA) wurde über Nacht bei leichtem schwenken in TBSTM geblockt. Die Immundetektion des Substratbindepoteins OpuBC erfolgte mit den Antikörpern AK OpuBC (5 µl/10 ml) und vom Substratbindepotein OpuCC erfolgte die Detektion mit den Antikörper AK OpuCC (8 µl/10 ml) (Kappes *et al.*, 1999). Die erste Inkubation mit den ersten Antikörpern wurde für 2 Stunden unter leichtem schwenken in 10 ml TBSTM durchgeführt. Die Nylon Transfer Membran wurde anschließend dreimal für 10 Minuten mit 30 ml TBST gewaschen bevor der sekundäre Antikörper AK AP Donkey Anti-Rabbit IgH (1 µl/10 ml) (Promega, Madison, WI, USA) in 10 ml TBSTM zur Inkubation für 1.5 Stunden hinzugegeben wurde. Danach wurde die Nylon Transfer Membran nochmals mit 50 ml TBST gewaschen und anschließend die Membran in 10 mM Tris pH 9 equilibriert. Der sekundäre Antikörper enthält eine Alkaline Phosphatase mit dessen Hilfe die Proteine detektiert werden können. Die Detektion der OpuBC und OpuCC Proteine (Blue 450 nm, 800 V) erfolgte im Storm860 (GE Healthcare Life Science, München, Deutschland). Die in Tris Puffer equilibrierte Nylon Transfer Membran wird mit dem Substrat ECF (Amersham Bioscience, Glattbrugg, Schweiz) benetzt und dann im Storm gescannt.

Tabelle 8: Lösungen für den Western-Blot.

| Lösung | Komponenten |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Waschpuffer TE | 10 ml 1 M Tris pH 7.5 2 ml 0.5 M EDTA |
| Inkubationspuffer TBST | 20 ml 1 M Tris pH 7.5 30 ml 5 M NaCl 0.5 ml Tween-20 |
| TBSTM | TBST mit 5% Magermilchpulver |
| Western-Blot Puffer (für 5 L) | 9.45 g Tris 45.04 g Glycin 1 L Methanol 1 g SDS |

2.6.9 Amylase-Test

Ein Amylase-Test von *B. subtilis* Stämmen erfolgte nach einer Transformation mit mutagenisierten Plasmiden (siehe 2.5.4), die durch die doppelt homologe Rekombination in das *amy* Gen im Chromosom von *B. subtilis* integrieren. Natürlicherweise besitzt *B. subtilis* ein Amylase-Gen, das es dem Bakterium erlaubt Stärke abzubauen. Dieses Gen ist für *B. subtilis* nicht essentiell und daher wird der Genlocus oft für die stabile Integration neuer Gene verwendet. Der Nachweis einer erfolgreichen Integration des gewünschten Gens erfolgte über ein Amy⁻ Phänotyp auf Stärkeplatten. Durch eine erfolgreiche Integration wurde das Amylase-Gen zerstört und das Bakterium war nicht mehr in der Lage Stärke abzubauen. Nach der Transformation von *B. subtilis* Stämmen (siehe 2.5.9) wurden Transformanten auf Stärkeplatten ausgestrichen (20 g Stärke, 1 g Hefextrakt, 3 g Pepton, 70 g NaCl und 15 g Agar pro L) und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurde eine Iod-Kaliumiodid-Lösung (0.5 % (w/v) Jod, 1 % (w/v) Kaliumiodid in H₂O) auf die Stärkeplatten verteilt (Cutting and Horn, 1990). Ist das Amylase-Gen intakt war ein deutlicher heller Hof erkennbar, während ein Hof bei einem zerstörten Amylase-Gen nicht sichtbar war.

2.6.10 Bestimmung des intrazellulären Prolin Pools von osmotisch gestressten *B. subtilis* Zellen

Für die intrazelluläre Quantifizierung von Prolin in *B. subtilis* wurde eine Kalometrische-Methode verwendet (Bates *et al.*, 1973 und Whatmore *et al.*, 1990). Die Methode basierte darauf, dass Ninhydrin bei niedrigem pH mit den Aminogruppen der Aminosäuren ein blauen Farbkomplex bildet, während bei sekundären Aminosäuren (wie z. B. Prolin) ein roter Farbkomplex gebildet wurde. Der Prolinderivatkomplex konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 480 nm gemessen werden, dabei nahm die Prolinkonzentration proportional zur Intensität des roten Farbstoffes zu (Lambert Beersches Gesetz).

Zur Bestimmung des intrazellulären Prolin Pools wurden *B. subtilis* Zellen bis zu einer OD₅₇₈ von 1.6 - 1.8 in SMM mit 1.2 M NaCl wachsen gelassen (in Abwesenheit oder in Anwesenheit von 25 - 1000 µM kompatibler Solute). Anschließend wurden 8 ml Bakterienkultur für 15 Minuten bei 20 °C Raumtemperatur und 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren. Für den Assay wurde das Zellpellet in 900 µl SSA-Lösung resuspendiert (3 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure) und über Nacht unter starkem schütteln (750 rpm) im Thermocycler bei Raumtemperatur wurden die Zellen aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand (50 bis 500 µl) in ein neues Röhrchen überführt. Zu dem Zellextrakt kamen 500 µl Ninhydrin-Lösung (1. 25 g Ninhydrin, 30 ml Eisessig, 20 ml 6 M Phosphorsäure) und 500 µl Eisessig hinzu und das gesamte Gemisch wurde für 1 Stunde im Wasserbad gekocht und danach auf Eis kühl gestellt. Zu der Lösung wurden 2 ml Toluol hinzugegeben und die Probe für 30 Sekunden sorgfältig gewortextet. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 rpm wird der Prolin-Ninhydrin-Farbkomplex in Küvetten überführt und die Absorption bei 480 nm gegen Toluol als Blindwert gemessen. Die Berechnung der intrazellulären Prolin Konzentration erfolgt über folgende Formel: $(\mu\text{l SSA} / (\text{OD}_{578} * 0,65 \mu\text{l} * x \text{ ml})) * (\Delta \text{ Extinktion} / (m * 10))$.

µl SSA = In wieviel µl SSA das Zellpellet gelöst wurde

x OD₅₇₈ = OD₅₇₈ der gewachsenen *B. subtilis* Kultur

0.65 µl = Zellvolumen von *B. subtilis* bei OD₅₇₈ 1

x ml = Wieviel Bakterienkultur abzentrifugiert wurde

Δ Extinktion = Extinktion des Prolin-Ninhydrin-Farbkomplexes (OD₄₈₀)

m = Steigung der Prolin-Kalibrationsgerade

2.6.11 Bestimmung der TreA-Aktivität

Zur Bestimmung der Expressionen von ausgewählten Genen wurde die TreA-Aktivität (Phospho- α -(1.1)-Glukosidase) in TreA-Reportergenfusionstämmen bestimmt, dabei wurde geschaut ob verschiedene kompatible Solute Einfluss auf die Genexpression unter hohen Osmolaritäten ausüben. Das chromogene Substrate pNPG (Phospho- α -(1.1)-Glucopyranosid) konnte über das TreA-Enzym umgesetzt werden, wobei eine gelbliche Färbung entstand. Dieses gelbliche Reaktionsprodukt konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantifiziert werden (Gotsche und Dahl, 1995).

Die *B. subtilis* Stämme JSB7 (*proH-treA*) und MBB9 (*opuA-treA*) trugen TreA-Reporterfusionen stabil in ihren Genom (Brill *et al.*, 2011b und Hoffmann *et al.*, 2013) und wurden in SMM und in SMM mit 1.2 M NaCl (in Abwesenheit oder in Anwesenheit von 1 mM kompatibler Solute) bis zu einer OD₅₇₈ von 1.5 kultiviert und anschließend 1 ml Bakterienkultur abgenommen und für den TreA Aktivitäts Assay eingesetzt (Gotsche und Dahl, 1995; Helfert *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 2013). Die TreA-Aktivität wurde definiert als [Units (mg Protein)⁻¹] (Miller, 1972).

3. Ergebnisse

3.1 DMSP als kompatibles Solute bei *B. subtilis*

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht ob DMSP und seine Derivate bei *B. subtilis* als kompatible Solute aktiv waren. Dafür wurde zuerst Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen bei Zugabe von DMSP und seine Derivate beobachtet. Desweiteren wurde der regulatorische Einfluss auf den Prolin Pool und die Repression der OpuA Expression unter Salzstress untersucht, denn es ist bekannt das kompatible Solute (z. B. Glycin Betain) regulatorische Einfluss auf die Expression der Prolinbiosynthese und des OpuA Transporters nehmen können. Schützen DMSP und seine Derivate *B. subtilis* unter verschiedenen Stressbedingungen, müssen die Substanzen in der Zelle akkumuliert werden. Unter Stressbedingungen sind die Opu Transporter für die Aufnahme der kompatiblen Solute beteiligt (siehe Abbildung 1). Mit verschiedenen Opu Deletionsstämmen wurde experimentell untersucht durch welche Transporter die Substanzen in die Zelle gelangen. Außerdem wurden Transport Studien mit radioaktiven Substanzen durchgeführt, dadurch konnten die kinetischen Parameter für die Akkumulation der Substanzen bestimmt werden. Die Affinität und das Substratprofil wird im wesentlichen durch die extrazellulären SBP der Opu Transporter bestimmt, deswegen wurden Bindungsassays mit gereinigten SBP durchgeführt und die Bindung der Substrate in einem *in silico* Modell im Detail geklärt. Mit einer bioinformatischen Untersuchung wurde geschaut wie die Verteilung der Opu Transporter in der Gattung *Bacillus* aussieht.

3.1.1 DMSP als Kohlenstoff- oder Schwefelquelle

Viele Mikroorganismen nehmen Substanzen aus ihrer Umgebung auf und können diese Stoffe als Nährstoffquelle nutzen. DMSP wird von marinen Mikroorganismen und wenigen Landpflanzen synthetisiert und kann von vielen Mikroorganismen abgebaut werden (Curson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012), allerdings ist nicht bekannt ob *B. subtilis* DMSP als Nährstoffquelle nutzen kann. DMSP war eine potenzielle Kohlenstoff- und Schwefelquelle. Um zu testen ob *B. subtilis* JH642 DMSP als Kohlenstoff- oder Schwefelquelle nutzen konnte, wurden die Zellen in SMM und in SMM mit 0.4 M Salz für 20 Stunden im Wasserbad wachsen gelassen (37 °C, 220 rpm). Im SMM wurde die Kohlenstoffquelle (28 mM Glukose) durch 32 mM DMSP ersetzt, außerdem wurde die Schwefelquelle (15 mM (NH₄)₂SO₄, 200 µM MgSO₄) durch 15 mM bzw. 200 µM DMSP ersetzt. Hohe DMSP

Konzentration können toxisch sein, daher wurden außerdem niedrige Konzentrationen (2 mM DMSP) für die Versuche eingesetzt.

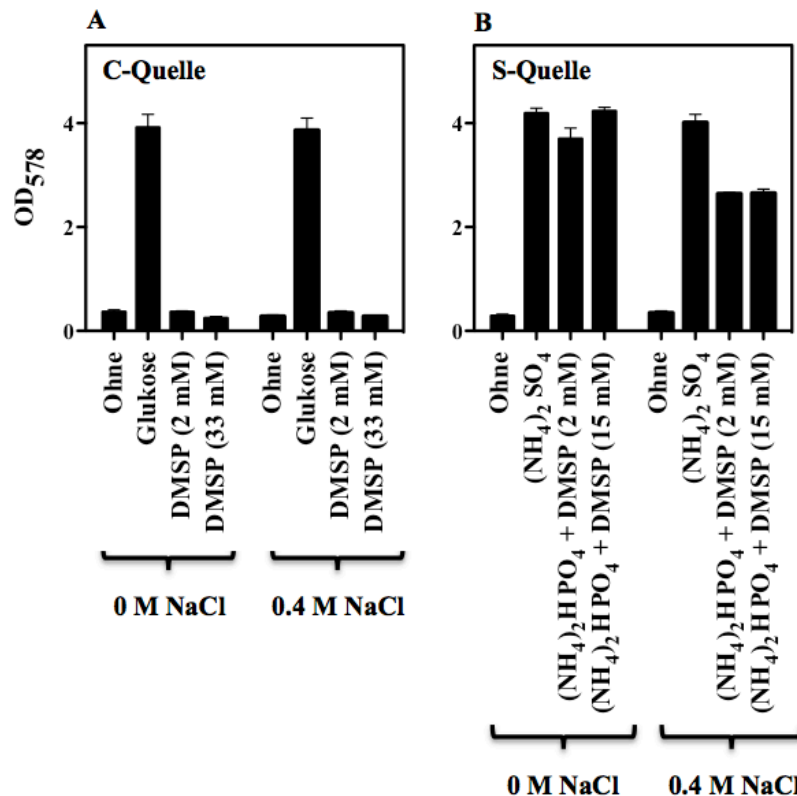


Abbildung 12: DMSP als Kohlenstoff- und Schwefelquelle bei *B. subtilis*. *B. subtilis* JH642 Zellen wurden in SMM und in SMM mit 0.4 M (37 °C, 220 rpm) für 20 Stunden kultiviert und das Wachstum photometrisch gemessen (OD₅₇₈). (A) Die Kohlenstoffquelle Glukose (28 mM) wurde im SMM durch 32 mM DMSP ersetzt. (B) Die Schwefelquelle (NH₄)₂SO₄ (15 mM) wurde im SMM durch 15 mM DMSP ersetzt. Die fehlende Stickstoffquelle wurde mit 15 mM (NH₄)₂HPO₄ ergänzt.

Im Wachstumsexperiment wurde nach 20 Stunden Inkubation von *B. subtilis* JH642 kein Wachstum beobachtet, wo DMSP als Kohlenstoff- oder Schwefelquelle verwendet wurde. Waren die normalen Kohlenstoff- oder Schwefelquellen (Glukose, (NH₄)₂SO₄ und MgSO₄) im SMM vorhanden, war normales Wachstum bei der Anwesenheit von 15 mM (NH₄)₂HPO₄ als Stickstoffquelle zu beobachten. *B. subtilis* konnte DMSP nicht als Kohlenstoff- und Schwefelquelle nutzen und gehört damit zu den Mikroorganismen welche DMSP nicht abbauen können.

3.1.2 Salz-, Kälte- und Hitzestress bei *B. subtilis*

Unter Stressbedingungen ist *B. subtilis* in der Lage kompatible Solute aus der Umgebung zu akkumulieren oder Glycin Betain über Cholin bzw. Prolin *de novo* zu synthetisieren, allerdings wird die Aufnahme von kompatiblen Soluten aus der Umgebung bevorzugt (Dinnbier *et al.*, 1988; Oren, 1990; Higgins, 1992; Akashi and Gojobori, 2002; Pittekov and

Bremer, 2011). Bei vielen kompatiblen Soluten konnte bereits gezeigt werden, dass sie *B. subtilis* unter Stressbedingungen schützen, insbesondere an den Temperaturwachstumsgrenzen (13 °C bzw. 52 °C) oder bei hoher Osmolarität (1.2 M NaCl) (Bremer, 2002; Holtmann and Bremer, 2004; Hoffmann and Bremer, 2011). Besonders Glycin Betain hat sich hierbei als potentes kompatibles Solut herausgestellt. Hier wurde DMSP, das natürliche Selenium Derivate DMSeP und sechs synthetische DMSP Derivate auf ihre protektiven Eigenschaften als kompatible Solute bei Salz-, Kälte- und Hitzestress untersucht.

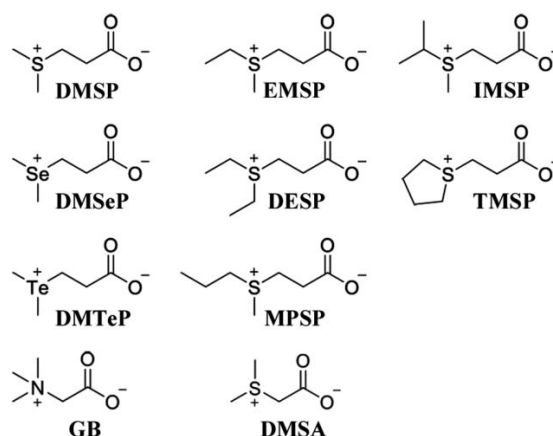


Abbildung 13: Strukturformeln von Glycin Betain, DMSA, DMSP und die natürlichen und synthetischen Derivate.

(A) *B. subtilis* JH642 wurde in SMM mit 1.2 M NaCl inkubiert (37 °C, 220 rpm), (B) *B. subtilis* 168 wurde in SMM über mehrere Tage inkubiert (13 °C, 220 rpm) und (C) *B. subtilis* JH642 wurde in SMM inkubiert (52 °C, 220 rpm). Das Wachstum wurde nach jeweils 1 Stunde bzw. beim Kälteexperiment nach 24 Stunden photometrisch bestimmt (OD₅₇₈). Für die verschiedenen Assays wurde 1 mM an kompatiblen Solut steril zum SMM dazugegeben. Der *B. subtilis* JH642 besaß ein kältesensitiven Phänotyp und deswegen wurde für die Kältestressexperimente der *B. subtilis* 168 Stamm benutzt, der kein Defekt im *ilvB* Gen besaß (siehe Punkt 2.4.2) (Wiegeshoff and Marahiel, 2007).

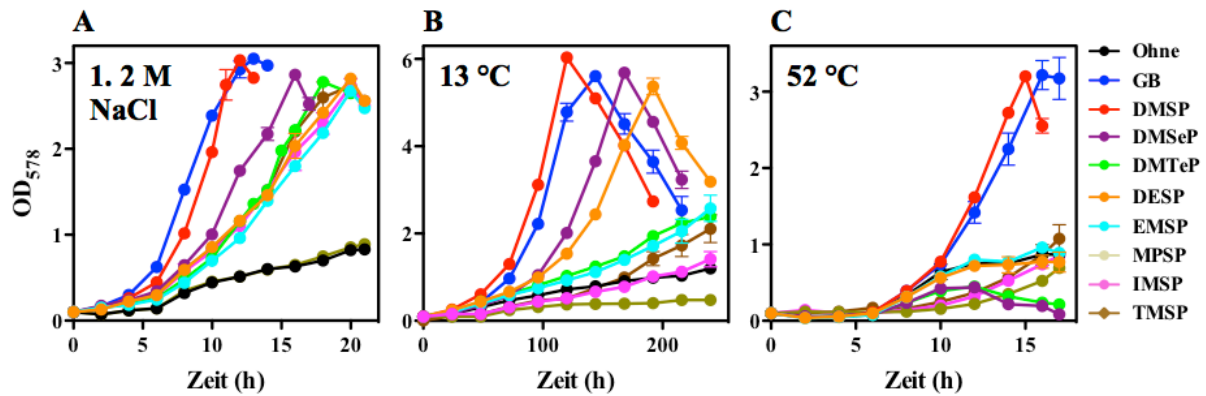


Abbildung 14: Protektion von *B. subtilis* bei Salz-, Kälte- und Hitzestress. (A) *B. subtilis* JH642 wurde in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute kultiviert. (B) *B. subtilis* 168 wurde in SMM bei 13 °C ohne und mit der Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute kultiviert. (C) *B. subtilis* JH642 wurde in SMM bei 52 °C ohne und mit der Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute kultiviert.

Die Wachstumskurven in der Abbildung 14 zeigten die protektiven Eigenschaften von DMSP und seinen Derivaten bei Salz-, Kälte- und Hitzestress. Als positiv Kontrolle wurden *B. subtilis* Zellen in Anwesenheit von Glycin Betain inkubiert, den bei Glycin Betain ist bekannt das es ein sehr gutes Stressprotektiva ist (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Bremer, 2002). Als negativ Kontrolle wurden *B. subtilis* Zellen ohne kompatible Solute inkubiert.

(A) Glycin Betain, DMSP und sechs DMSP Derivate waren bei *B. subtilis* JH642 osmoprotetktiv. Nur das Derivat MPSP zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum. Alle anderen Solute bieten ein Wachstumsvorteil für die Zellen unter hohen osmotischen Bedingungen, allerdings im unterschiedlichen Maße. Glycin Betain und DMSP waren sehr gute Osmoprotektiva, während DMSeP ein moderates Osmoprotektiv war. Die Derivate DMTeP, EMSP, DESP, IMSP und TMSP ermöglichen ebenfalls ein Wachstumsvorteil, allerdings trat der Schutz wesentlich später ein. Die natürlichen Solute zeigten den besten Osmoschutz, während bei den synthetischen DMSP Derivaten der Osmoschutz später eintrat.

(B) Bei Kältestress und ein Wachstum über mehrere Tage bei 13 °C zeigten nur Glycin Betain, DMSP, DMSeP und EMSP ein Wachstumsvorteil für gestresste *B. subtilis* 168 Zellen. Hier waren DMSP und Glycin Betain die besten Solute, während der Kältestressschutz bei DMSeP und EMSP erst ein paar Tage später auftrat. Alle anderen Solute, wie auch die negativ Kontrolle, zeigten kein Wachstumsvorteil unter diesen Bedingungen. Hier zeigten die natürlichen Solute Glycin Betain, DMSP und DMSeP, wie bei Salzstress, den besten Schutz. Jediglich das synthetische Derivate EMSP zeigte Kältestressprotektion.

(C) Das Wachstum von *B. subtilis* JH642 bei 52 °C konnte nur durch die Solute Glycin Betain und DMSP gewährleistet werden. Beide Solute waren ausgezeichnete Hitzestressprotektiva. Bei allen weiteren Solute, wie auch bei der negativ Kontrolle, konnte kein Wachstum bei 52 °C beobachtet werden.

Durch die Salz-, Kälte- und Hitzestress Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass DMSP für *B. subtilis* ein sehr gutes Stressprotektiva darstellt. DMSP schützte die Zellen unter allen drei Stressbedingungen im gleichen Ausmaß wie Glycin Betain. DMSP kann nicht verstoffwechselt werden und ist daher ein ausgezeichnetes Stressprotektiva für *B. subtilis*. Das natürliche DMSP Derivat DMSeP und die synthetischen Derivate zeigten alle Schutz bei Salzstress, bei Kältestress allerdings nur noch DMSeP und EMSP. Keines der Derivate zeigte ein Wachstum bei Hitze. Herauszunehmen war das Derivat MPSP, denn es zeigte kein Schutz unter allen drei Stressbedingungen. MPSP konnte nicht von den *B. subtilis* Zellen akkumuliert werden und wurde deswegen für die weiteren Untersuchungen nicht weiter beachtet (siehe Abbildung 19).

3.1.3 Regulatorischer Einfluss von DMSP und seinen Derivaten auf die Prolinbiosynthese und auf die Expression des *opuA* Operons

Die Adaption von *B. subtilis* an hohe Osmolaritäten wird durch die Biosynthese und Akkumulation hoher Konzentrationen an Prolin von der Zelle bewerkstelligt (Whatmore *et al.*, 1990; Brill *et al.*, 2011a,b). Die interne Prolinkonzentration, die bis auf 500 mM in der Zelle steigen kann, ist dabei abhängig von der Osmolarität der Umgebung. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der äußeren Osmolarität und der internen Prolinkonzentration (Brill *et al.*, 2011a; Hoffmann *et al.*, 2013; Zaprasis *et al.*, 2013). Kann *B. subtilis* kompatible Solute aus der Umgebung akkumulieren, wird die osmostress-adaptive Prolinbiosynthese runter reguliert (Hoffmann *et al.*, 2013; Bashir *et al.*, 2014b).

Die Aufnahme von kompatiblen Soluten (z. B. Glycin Betain) kann die intrazelluläre Prolinkonzentration als auch die Expression des *proHJ* Operons maßgebend beeinflussen. Um zu testen ob DMSP und die DMSP Derivate ein ähnlichen Einfluss auf die Prolinbiosynthese nehmen konnten, wurde die interne Prolinkonzentration und die Expression des *proHJ* Operons bestimmt (Promotoraktivität).

Die Beeinflussung der internen Prolinkonzentration durch die kompatiblen Solute wurde bei *B. subtilis* JH642 in SMM mit 1.2 M NaCl bestimmt (37 °C, 220 rpm). Glycin Betain, DMSP und seine Derivate wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zum Medium hinzugeben (Endkonzentration 25 - 1000 µM) und die intrazelluläre Prolinkonzentration bestimmt (siehe 2.6.10).

Die Beeinflussung auf die Expression bei Anwesenheit der Solute in der Zelle auf das *proHJ* Operon wurde durch eine TreA-Reportergenfusionen bestimmt. Der *B. subtilis* Stamm JSB7 besitzt eine *proHJ-treA* Fusion im Genom (Einzelkopie). Diese TreA Reportergenfusionen ist unter der Kontrolle des nativen *proHJ* Promotors und die Expression des Operons kann durch eine TreA-Aktivitätsbestimmung ermittelt werden. Der *B. subtilis* Stamm JSB7 wurde in SMM mit 1.2 M NaCl ohne und mit der Anwesenheit kompatibler Solute (Endkonzentration 1 mM) kultiviert (37 °C, 220 rpm) und die Zellen für die TreA-Aktivitätsbestimmung eingesetzt (siehe 2.6.11).

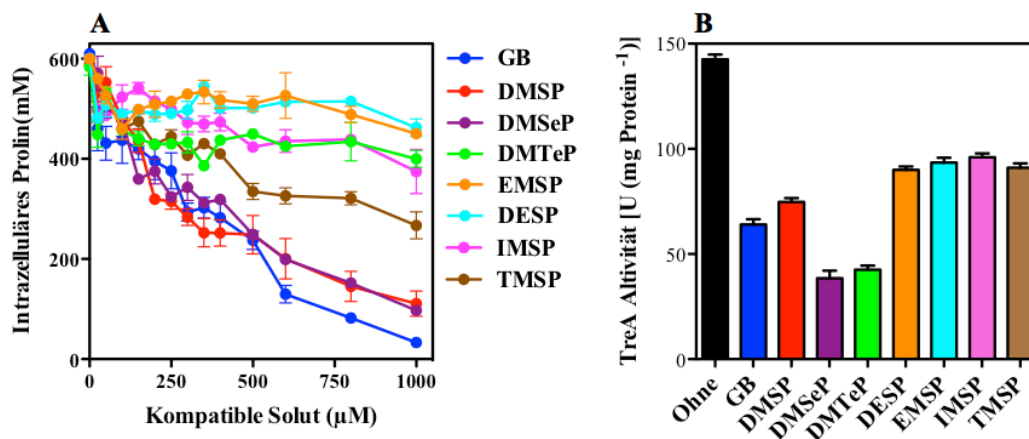


Abbildung 15: Einfluss von DMSP und seinen Derivaten auf die *de novo* Synthese der intrazellulären Prolinkonzentration und auf die Expression des *proHJ* Operons über eine TreA Aktivitätsmessung. (A) *B. subtilis* JH642 wurde in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) in der Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute (Endkonzentration 25 - 1000 µM) inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von 1.6 wurden die Zellen für eine intrazelluläre Quantifizierung der Prolinkonzentration genommen. (B) Der *B. subtilis* Stamm JSB7 (*proHJ-treA*) wurde in SMM mit 1.2 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ 1.5 wachsen gelassen. Verschiedene kompatible Solute wurden in der Endkonzentration von 1 mM zum SMM dazugegeben und die Zellen wurden für einer Aktivitätsmessung der TreA-Aktivität eingesetzt. Dargestellt sind die Experimente aus zwei unabhängigen Kulturen. Die Standartabweichungen repräsentieren die Unterschiede bei den Enzymmessungen.

(A) Osmotisch gestresste *B. subtilis* Zellen akkumulieren 500 - 600 mM Prolin bei 1.2 M NaCl, die intrazelluläre Prolinkonzentration wird allerdings bei der Anwesenheit von kompatiblen Soluten verringert. Die Titrationskurve in Abbildung 15 A zeigte den Einfluss von Glycin Betain, DMSP und seinen Derivaten auf den intrazellulären Prolin Pool, wenn die Konzentration der kompatiblen Solute von 25 - 1000 µM erhöht wurde. Glycin Betain drückte die Prolinkonzentration nahezu auf das Basal-Level von 10 - 15 mM Prolin, aber auch DMSP und das natürliche Derivat DMSeP besaßen ein ähnlichen Effekt. Bei allen synthetischen DMSP Derivaten wurde die intrazelluläre Prolinkonzentration nur moderat verringert. Dazwischen lag das Derivat TMSP.

(B) Wurden kompatible Solute aus der Umwelt akkumuliert, konnten sie die Expression des *proHJ* Operons beeinflussen. In Abbildung 15 B wurde die Aktivität der Expression des *proHJ* Operons über eine TreA-Aktivität kalkuliert. Bei der Abwesenheit von kompatiblen Soluten konnte eine Expression von ca. 140 Units (mg pro Protein⁻¹) kalkuliert werden. Alle kompatiblen Solute reprimierten bei ihrer Anwesenheit die Expression des Operons. Die kompatiblen Solute Glycin Betain, DMSP, DMSeP und DMTeP reprimierten die Expression um die Hälfte, während die Solute EMSP, DESP, IMSP und TMSP die Expression lediglich moderat reprimierten. Die Solute DMSeP und DMTeP zeigten den stärksten Einfluss auf die Expression.

Die Bestimmung der intrazellulären Prolinkonzentration und die Expression des *proHJ* Operons zeigten beim Solute DMTeP eine Diskrepanz. Während die intrazelluläre Prolinkonzentration lediglich moderat verringert wurde, zeigte DMTeP die stärkste Reprimierung der *proHJ* Expression von über die Hälfte. Bei allen anderen kompatiblen Soluten korrelierte die intrazelluläre Prolinkonzentration mit der Reprimierung der Expression.

Die Akkumulation von kompatiblen Soluten hatte bei *B. subtilis* nicht nur ein Einfluss auf die Prolinbiosynthese (siehe Abbildung 15), sondern auch auf die Genexpression osmotisch induzierter Gene (Hoffmann *et al.*, 2013; Kohlstedt *et al.*, 2014). Das *opuA* Operon war osmotisch induzierbar und daher war der Promotor ein ausgezeichneter Reporter für die Induktion von Genen bei hohen Osmolaritäten. Die Expression des *opuA* Operons unter Salzstress nahm mit der Akkumulation von Glycin Betain ab (Hoffmann *et al.*, 2013). Der *B. subtilis* Stamm MBB9 (siehe Tabelle 2) trug eine *opuA-treA* Reportergenfusion als Einzelkopie fest im Genom. Mit dieser TreA-Reportergenfusion konnte die Aktivität des nativen *opuA* Promotors unter Salzstress untersucht werden bzw. wie die Expression bei der Anwesenheit von DMSP und seinen Derivaten beeinflusst wurde.

MBB9 Zellen wurden in SMM und in SMM mit 1.2 M (37 °C, 220 rpm) ohne bzw. mit kompatiblen Soluten (Endkonzentration 1 mM) kultiviert und die Aktivität der Expression durch das Level der TreA-Aktivität bestimmt (siehe 2.6.11).

Tabelle 9: Repression der OpuA Expression mit verschiedenen kompatiblen Soluten.

| Kompatible Solute | TreA-Aktivität [U (mg Protein⁻¹)] | |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|
| | Ohne NaCl | 1. 2 M NaCl |
| Ohne | 66 ± 2 | 561 ± 35 |
| Glycin Betain | 18 ± 2 | 88 ± 3 |
| Carnitin | 17 ± 2 | 102 ± 4 |
| DMSP | 16 ± 1 | 107 ± 16 |
| DMSep | 19 ± 1 | 223 ± 6 |
| DMTeP | 30 ± 1 | 330 ± 19 |
| EMSP | 24 ± 1 | 313 ± 3 |
| DESP | 39 ± 3 | 381 ± 9 |
| IMSP | 25 ± 3 | 297 ± 9 |
| TMSP | 19 ± 1 | 224 ± 10 |

Der *B. subtilis* Stamm MBB9 (*opuA-treA*) wurde in SMM ohne und mit 1.2 M NaCl bis zu einer OD₅₇₈ 1.5 wachsen gelassen. Verschiedene kompatible Solute wurden in der Endkonzentration von 1 mM zum SMM dazugegeben und die Zellen wurden für einer Aktivitätsmessung der TreA-Aktivität eingesetzt. Dargestellt sind die TreA Aktivitätsmessungen aus zwei unabhängig gewachsenen Kulturen, die in Doppelbestimmung für die TreA Aktivitätsmessung benutzt wurden. Die Standardabweichungen repräsentieren die Unterschiede bei den Enzymmessungen.

Die Expression des *opuA-treA* Fusionsproteins wurde bei 1.2 M NaCl ohne kompatible Solute um das 8.5 fache erhöht. Glycin Betain, Carnitin und DMSP reprimierten in gestressten Zellen die Expression um das 5 - 6 fache. Nicht nur in gestressten Zellen fand eine Repression statt, sondern auch in nicht gestressten Zellen, hier reprimierten Glycin Betain, Carnitin und DMSP das TreA-Aktivitätslevel um das 4.9 bis 6.6 fache. Die Transkription von *opuA-treA* wurde in gestressten Zellen bei der Anwesenheit der DMSP Derivate zwischen das 1.5 bis 2.5 fache verringert, während die Transkription bei nicht gestressten Zellen um das 1.7 bis 3.5 fache reduziert wurde.

Die Experimente konnten ein regulatorischen Einfluss von DMSP und seinen Derivaten auf die Prolinbiosynthese und auf die Transkription osmotisch induzierter Gene zeigen. Wie bei den Wachstumsversuchen unter verschiedenen Stressbedingungen, zeigte DMSP und sein natürliches Derivat DMSep den größten Einfluss, während die synthetischen Derivate ein moderaten Einfluss aufwiesen.

3.1.4 Akkumulation von DMSP und seinen Derivaten über die Transporter OpuA und OpuC

Die voran gegangenden Experimente zeigten das DMSP und seine sechs Derivate *B. subtilis* Zellen vor Stressbedingungen schützten. Außerdem konnte ein Einfluss der kompatiblen Solute auf die Prolinbiosynthese unter osmotischen Bedingungen und auf die Repression der OpuA Expression unter osmotischen Bedingungen gezeigt werden. Dafür muss *B. subtilis* die Solute aus der Umwelt aufnehmen. Unter osmotischen Stressbedingungen exprimiert *B. subtilis* fünf Opu Transporter (Bremer, 2002). Insbesondere die ABC Transporter OpuA und OpuC, sowie der Symporter OpuD spielen eine wichtige Rolle, denn diese Transporter akkumulieren mehrere unterschiedliche kompatible Solute. Die Transporter OpuB und OpuE transportieren nur Cholin (OpuB) und Prolin (OpuE) ins Zellinnere (siehe Abbildung 1).

Zur Überprüfung durch welche Opu Transporter DMSP und seine Derivate aufgenommen wurden, wurden verschiedene Sets von Opu Mutantenstämmen konstruiert (siehe 2.5.6 und Tabelle 2). Die Aufnahme der kompatiblen Solute Glycin Betain, DMSP und die DMSP Derivate (Endkonzentration 1 mM) wurde in den Opu Deletionsstämmen SBB1 (OpuA⁺), SBB2 (OpuC⁺) und SBB4 (OpuA⁻ OpuC⁻) in SMM mit 1.2 M NaCl beobachtet (37 °C, 220 rpm). Dazu wurde nach 13 Stunden das Wachstum photometrisch bestimmt (OD₅₇₈).

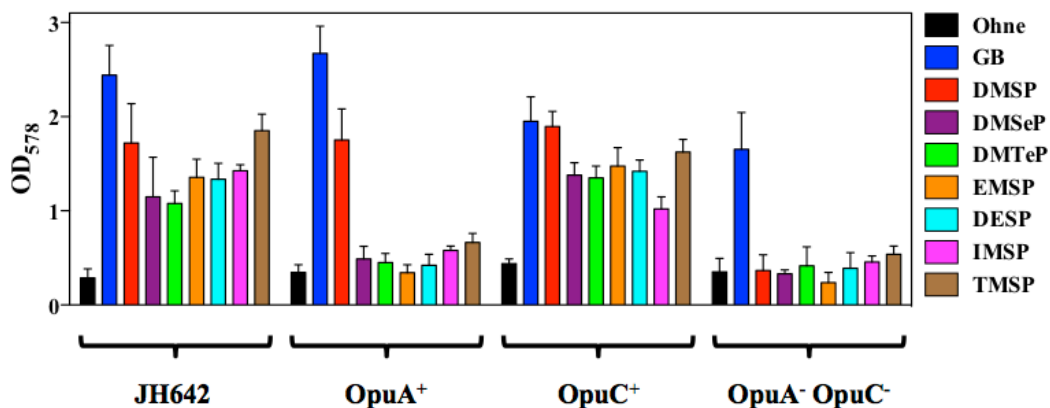


Abbildung 16: Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten über die Transporter OpuA und OpuC unter osmotischen Bedingungen. Die *B. subtilis* Stämme JH642, SBB1 (OpuA⁺), SBB2 (OpuC⁺) und SBB4 (OpuA⁻ OpuC⁻) wurden in SMM mit 1.2 M NaCl ohne und mit der Anwesenheit von 1 mM verschiedener kompatibler Solute kultiviert. Das Wachstum wurde nach 13 Stunden photometrisch bestimmt (OD₅₇₈). Dargestellt sind die Experimente aus drei unabhängigen Versuchen mit zwei technischen Parallelen mit Standardabweichungen.

Ein Set aus *B. subtilis* JH642 Derivat Stämmen, bei den nur ein Opu Transporter funktionsfähig war, ermöglichte die Bestimmung welche Opu Transporter für die Aufnahme von DMSP und seine Derivate verantwortlich war. Als positiv Kontrolle fungierte in diesem Experiment Glycin Betain, denn die Aufnahme durch OpuA, OpuC und OpuD ist bereits

bekannt (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Bremer, 2002). Bei der negativ Kontrolle wurde kein kompatibles Solut zum SMM dazugegeben. Hier bzw. wenn keine Solute akkumuliert werden konnten ist ein vermindertes Wachstum zu beobachten. Die OD₅₇₈ Werte lagen zwischen 0.3 - 0.5.

Der Wachstumsversuch unter osmotischen Bedingungen zeigte nach 13 Stunden, dass die Transporter OpuA und OpuC für die Akkumulation von DMSP verantwortlich waren, denn bei diesen Stämmen war ein Wachstum in Anwesenheit von DMSP zu erkennen. Das Wachstum in den Stämmen SBB1 (OpuA⁺) und SBB2 (OpuC⁺) war etwas schlechter als bei Glycin Betain. Die DMSP Derivate wurden nicht von OpuA aufgenommen, denn hier zeigte sich kein Wachstumsunterschied zur negativ Kontrolle. Der Transport aller DMSP Derivate wurde vom Transporter OpuC bewältigt. Die DMSP Derivate zeigten ein Wachstum beim SBB2 (OpuC⁺) Stamm, der allerdings etwas schlechter war als bei DMSP oder Glycin Betain. Bei Kältestress waren nur die Solute DMSP, DMSeP und EMSP protektiv. Bei Hitzestress war nur noch DMSP protektiv und keines der Derivate (siehe Abbildung 14 B und C).

Welche Opu Transporter bei der Akkumulation von DMSP bei Kälte- und Hitzestress, sowie den Derivaten DMSeP und EMSP bei Kältestress, beteiligt waren wurde ebenfalls untersucht. Für den Kältestress Versuch wurden die *B. subtilis* 168 Opu Derivatstämme JGB25 (OpuA⁺), JGB24 (OpuC⁺) und JGB23 (OpuA⁻ OpuC⁻) für ein Wachstumsversuch verwendet. Die *B. subtilis* 168 Stämme wurden bei 13 °C in SMM für einen längeren Zeitraum inkubiert und nach 168 Stunden das Wachstum photometrisch bestimmt (OD₅₇₈). Die kompatiblen Solute Glycin Betain, DMSP, DMSeP und EMSP wurden zum SMM dazugegeben (Endkonzentration 1 mM). Das identische Set an *B. subtilis* JH642 Opu Derivatstämmen wie beim Salzstress Experiment wurde für den Hitzestress Assay verwendet (52 °C, 220 rpm). Hier wurde das Wachstum nach 13 Stunden mit den kompatiblen Soluten Glycin Betain und DMSP (Endkonzentration 1 mM) photometrisch bestimmt (OD₅₇₈).

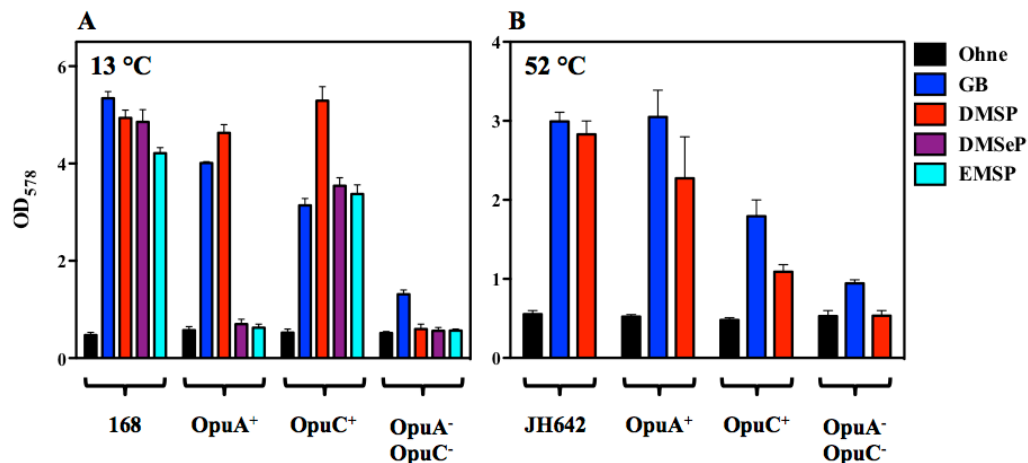


Abbildung 17: Transport von DMSP über OpuA und OpuC bei Kälte- und Hitzestress. (A) Die *B. subtilis* 168 Stämme JGB25 (OpuA⁺), JGB24 (OpuC⁺) und JGB23 (OpuA⁻ OpuC⁻) wurden bei 13 °C in SMM ohne oder mit den angegebenen kompatiblen Soluten kultiviert. Das Wachstum wurde nach 168 Stunden photometrisch gemessen. (B) Die *B. subtilis* Stämme JH642, SBB1 (OpuA⁺), SBB2 (OpuC⁺) und SBB4 (OpuA⁻ OpuC⁻) wurden in SMM ohne oder mit den angegebenen Soluten bei 52 °C kultiviert und das Wachstum der Kulturen nach 13 Stunden photometrisch gemessen. Dargestellt sind die Experimente aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen.

Die Transporter die bei Salzstress für die Akkumulation von Glycin Betain, DMSP, DMSeP und EMSP verantwortlich waren, ermöglichten auch bei Kälte- und Hitzestress ein Wachstum der *B. subtilis* 168 und JH642 Stämme. DMSP wurde auch bei Kälte und Hitze von den Transportern OpuA und OpuC aufgenommen. Auch bei Kältestress wurden die DMSP Derivate DMSeP und EMSP durch den OpuC Transporter aufgenommen, denn nur hier fand ein Wachstum der Zellen mit den kompatiblen Soluten statt.

Durch diese Wachstumsexperimente mit verschiedenen Opu Deletionsmutanten konnten die ABC Transporter OpuA und OpuC für den DMSP Transport ausgemacht werden. Beide Transporter akkumulieren DMSP bei allen drei Stressbedingungen und erlauben den Zellen bei diesen Bedingungen zu wachsen. Die DMSP Derivate wurden im Gegensatz zu DMSP nur durch den OpuC Transporter aufgenommen.

3.1.5 Kinetische Parameter bei der Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten bei den Transportern OpuA und OpuC

Die Transporter OpuA und OpuC sind für die Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten verantwortlich. Mit radioaktivmarkierten [1-C¹⁴]-Glycin Betain konnte Kappes *et al.*, 1996 die kinetischen Parameter für die Aufnahme von Glycin Betain bei beiden Transportern bestimmen. Bei OpuA mit Glycin Betain wurde ein K_m Wert von 2. 4 μ M und bei OpuC wurde ein K_m Wert von 6 μ M ermittelt.

Für eine detaillierte Studie der Aufnahme von DMSP und seine Derivate durch die Opu Transporter OpuA und OpuC, wurden ebenfalls radioaktivmarkierte $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain Transport Studien mit den *B. subtilis* Stämmen SBB1 (OpuA^+) und SBB2 (OpuC^+) durchgeführt. Die Zellen wuchsen in SMM mit 0.4 M NaCl und wurden bei einer OD_{578} 0.3 für die Transport Experimente eingesetzt (siehe 2.4.4). DMSP und die Derivate wurden bei dem Transport Assays als Inhibitoren eingesetzt, die mit dem radioaktivmarkierten $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain um die Aufnahme konkurrierten (Kompetetive Inhibition). Die Aufnahme der Solute folgte einer Michaelis-Menten Kinetik mit dessen hilfe die kinetischen Parameter bei der Aufnahme der Solute kalkuliert werden konnte. Zuerst wurden die kinetischen Parameter für DMSP bei OpuA bestimmt.

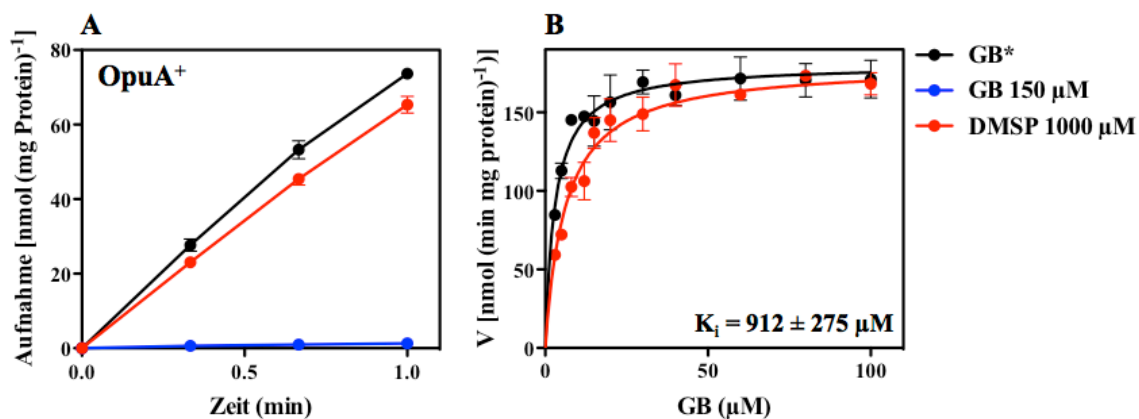


Abbildung 18: Aufnahme und Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain beim OpuA Transporter in der Anwesenheit von DMSP als Inhibitor. Der *B. subtilis* Stamm SBB1 (OpuA^+) wurde in SMM mit 0.4 M NaCl inkubiert und für Transport Studien verwendet. (A) Aufnahme von radioaktivmarkierten $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain bei der Anwesenheit von 150 μM Glycin Betain und 1000 μM DMSP (Konzentration des Substrates im Assay 3 μM). (B) Michaelis-Menten Kinetik der kompetitiven Inhibition vom $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain Transport bei der Anwesenheit von 1000 μM DMSP (Konzentrationen des Substrates im Assay von 3 - 100 μM). Dargestellt sind die Experimente aus drei unabhängigen Kulturen und Transport Assays mit Standardabweichung.

In Abbildung 18 A ist die Inhibition des $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain transportes mit 150 μM Glycin Betain und 1000 μM DMSP gezeigt. Eine Inhibition mit DMSP erforderte eine hohe Konzentration, während bereits eine geringe Glycin Betain Konzentration die $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain Aufnahme stark einschränkte. Die starke Inhibition von Glycin Betain lag an den hochaffinen K_m Wert von $3 \mu\text{M} \pm 1$ und die hohe V_{max} von $180 \pm 4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg pro Protein}^{-1}$ von Glycin Betain für OpuA. Im Gegensatz zu der sehr guten Aufnahme von Glycin Betain zeigte DMSP eine niedrige Affinität zum OpuA Transporter mit einen K_i Wert von $912 \pm 275 \mu\text{M}$.

Die Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten erfolgte durch den OpuC Transporter. Auch für die Aufnahme der Solute durch OpuC wurden die kinetischen Parameter ermittelt.

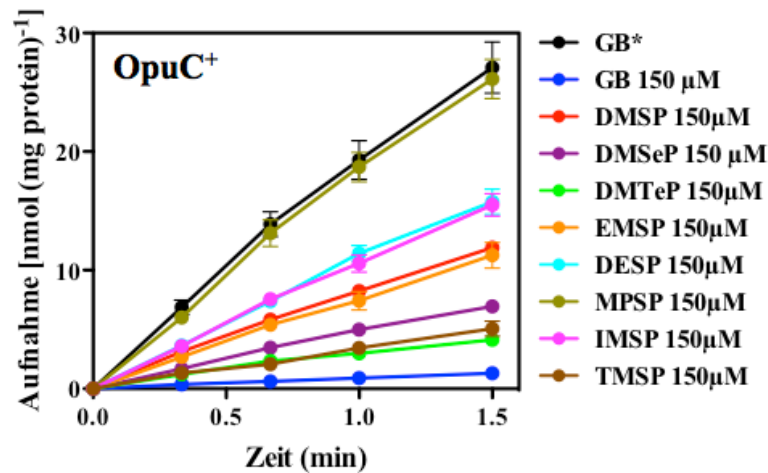


Abbildung 19: Aufnahme von [1-¹⁴C] Glycin Betain bei der Anwesenheit von DMSP und seinen Derivaten beim OpuC Transporter. Der *B. subtilis* Stamm SBB2 (OpuC⁺) wurde in SMM mit 0.4 M NaCl inkubiert und für Transport Studien verwendet. Dargestellt ist die Inhibition der Aufnahme von [1-¹⁴C] Glycin Betain bei der Anwesenheit von 150 µM der angegebenen verschiedenen kompatiblen Solute (Konzentration des Substrates im Assay 3 µM). Dargestellt sind die Experimente aus drei unabhängigen Kulturen und Transport Assays mit Standardabweichung.

In der Abbildung 19 sind die Inhibitionen bei der Aufnahme von [1-¹⁴C] Glycin Betain beim OpuC Transporter mit Glycin Betain, DMSP und seinen Derivaten gezeigt. Bereits geringe Inhibitorkonzentrationen von 150 µM der kompatiblen Solute schränkten die Aufnahme von [1-¹⁴C] Glycin Betain stark ein. Das DMSP Derivat MPSP, das auch keine Protektion bei den Wachstumsversuchen zeigte hatte, konnte die Glycin Betain Aufnahme nicht inhibieren. Damit konnte verstanden werden warum MPSP nicht bei *B. subtilis* stressprotektiv war (siehe Abbildung 14).

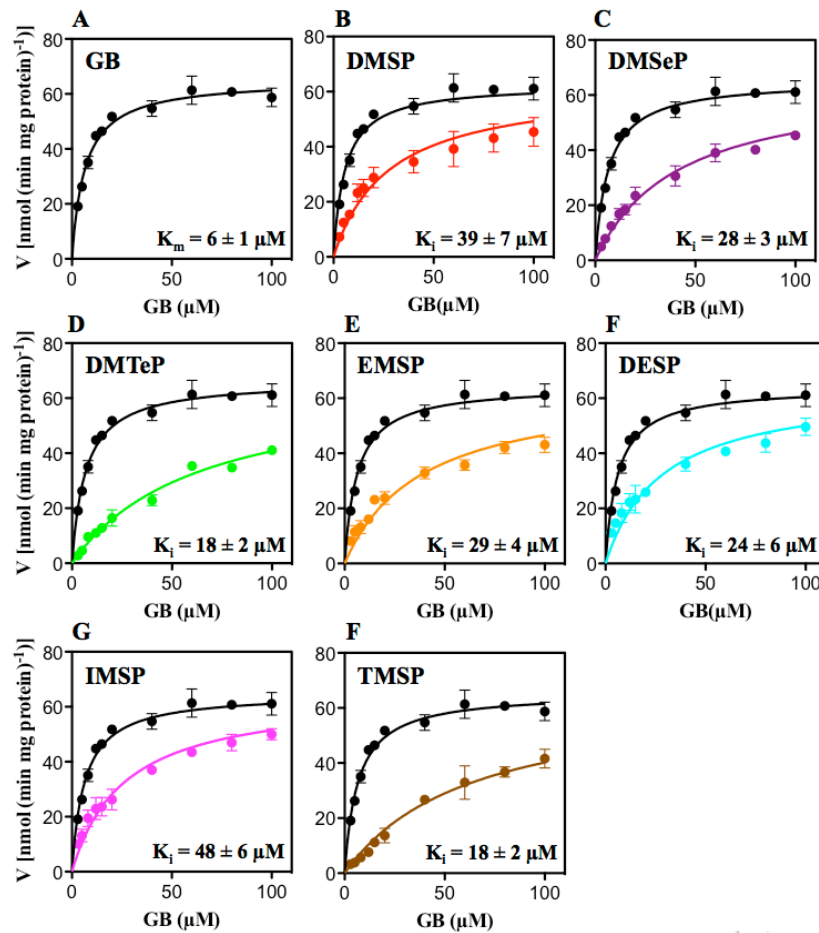


Abbildung 20: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von $[1-^{14}\text{C}]$ Glycin Betain durch den OpuC Transporter ohne und bei der Anwesenheit von DMSP und sein Derivaten. Michaelis-Menten Kinetik der kompetitiven Inhibition vom $[1-^{14}\text{C}]$ Glycin Betain Transport bei der Anwesenheit von $150\ \mu\text{M}$ der angegebenen kompatiblen Solute (Konzentrationen des Substrates im Assay von $3 - 100\ \mu\text{M}$). Dargestellt sind die Experimente aus zwei unabhängigen Kulturen und Transport Assays mit Standardabweichung.

Die kinetischen Parameter bei den Aufnahme Experimente mit $[1-^{14}\text{C}]$ Glycin Betain bei der Anwesenheit von $150\ \mu\text{M}$ von DMSP und seinen Derivaten sind in Abbildung 20 gezeigt. Die Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten durch den OpuC Transporter ergaben ähnliche hochaffine K_i Werte zwischen 18 und $39\ \mu\text{M}$ für die verschiedenen kompatiblen Solute. Der Glycin Betain Transport durch das OpuC System offenbarte einen hochaffinen Transport mit einem K_m Wert von 7 ± 1 und einer V_{max} von $65 \pm 1\ \text{nmol min}^{-1}\ \text{mg pro Protein}^{-1}$.

Die Transport Studien mit $[1-^{14}\text{C}]$ Glycin Betain für den OpuA und OpuC Transporter zeigten die Affinitäten der kompatiblen Solute zu den Transportern. Die Affinität von DMSP zum OpuA Transportsystem ist sehr gering. Die hohe Geschwindigkeit des Transporters konnte die geringe Affinität von DMSP kompensieren und es konnte genügend DMSP ins Zellinnere transportiert werden um die Zelle vor Stress zu schützen (siehe Abbildung 16 und 17). Der OpuC Transporter war für DMSP und seine Derivate ein hochaffiner Transporter. Die

niedrige Transportgeschwindigkeit wurde durch die hohen Affinitäten zu den kompatiblen Soluten kompensiert.

3.1.6 Bindungsaffinitäten der extrazellulären SBP OpuAC und OpuCC zu DMSP und seine Derivate

Die durchgeführten radioaktiven Transport Assays klärten die kinetischen Parameter für die Aufnahme der Solute bei *B. subtilis* *in vivo* auf. Der erste notwendige Schritt für die Aufnahme der Solute, was auch den K_m Werte determiniert, war eine Bindung der Substrate an die extrazellulären SBP OpuAC beim OpuA Transporter und OpuCC beim OpuC Transporter (Kappes *et al.*, 1999; Berntsson *et al.*, 2010; Eitinger *et al.*, 2010). Um diese erste Bindung der kompatiblen Solute an den Transporter im Detail zu studieren, wurden die Bindungsaffinitäten der rekombinanten SBP OpuAC und OpuCC bestimmt. Die *opuAC* und *opuCC* Gene von *B. subtilis* wurden in Überexpressionsvektoren kloniert (siehe 2.5.10), über eine heterologe Proteinexpression in *E. coli* Zellen produziert (siehe 2.6.3) und über eine Affinitätschromatographie gereinigt (siehe 2.6.4). Die Bindungsaffinitäten der kompatiblen Solute konnten mit Fluoreszenz spektroskopischen Untersuchung bestimmt werden. Die Bindung der Solute an das rekombinante OpuAC bzw. OpuCC Protein folgten einer Michaelis-Menten Kinetik, dadurch konnten die kinetischen Parameter der Bindungsaffinitäten kalkuliert werden (siehe 2.6.6). Zuerst wurde die Bindungsaffinität von DMSP zu dem rekombinanten OpuAC Protein bestimmt, gefolgt von Fluoreszenz spektroskopischen Untersuchungen mit dem rekombinanten OpuCC Protein.

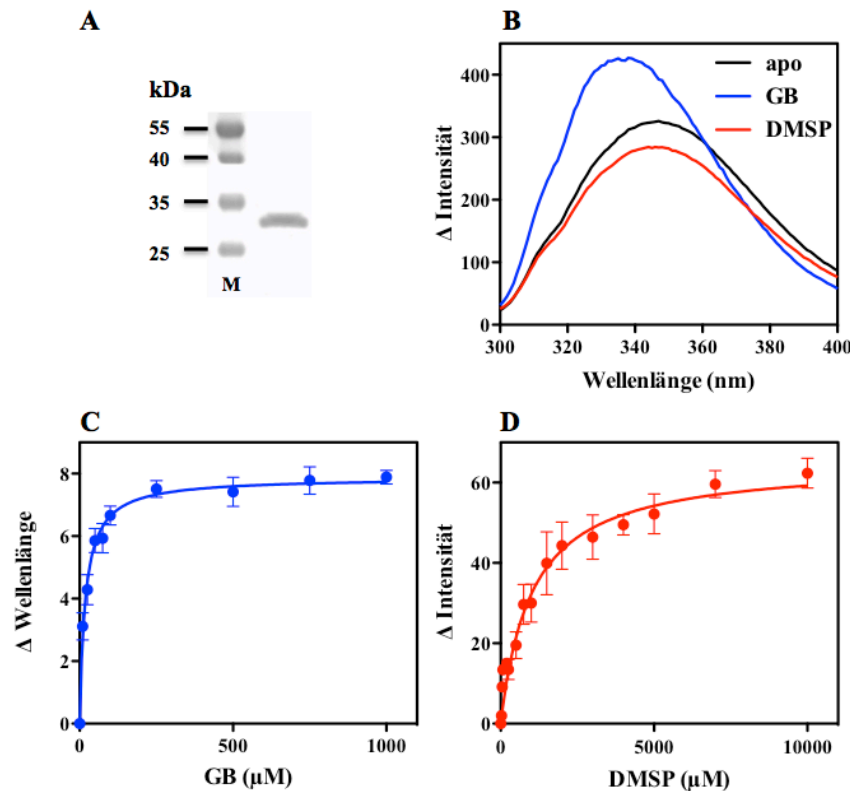


Abbildung 21: Michaelis-Menten Kinetik bei der Bindungsaffinität von DMSP zu OpuAC. (A) 15%iges SDS-Gel vom gereinigten OpuAC Protein. M = Protein Marker; OpuAC = 5 μ g gereinigtes OpuAC Protein. (B) Fluoreszenzspektrum vom gereinigten OpuAC Protein (1 μ M) ohne und mit 500 μ M Glycin Betain und DMSP. (C) Kinetik der Bindungsaffinität von OpuAC (1 μ M) zu Glycin Betain über eine intrinsische Tryptophanfluoreszenz Spektroskopie. Die Bindung von Glycin Betain resultierte in einer Änderung der Emissionswellenlänge. (D) Kinetik der Bindungsaffinität von OpuAC (1 μ M im Assay) zu DMSP über eine intrinsische Tryptophanfluoreszenz Spektroskopie. Die Bindung von DMSP resultierte in einer Änderung der Fluoreszenzintensität. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die Bindung von Glycin Betain an das rekombinante gereinigte OpuAC Protein führte zu einer Änderung der Emissionswellenlänge von 8 nm bei der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz Spektroskopie (Abbildung 21 B und C). Die Kalkulation der Dissoziationskonstante des OpuAC-Glycin Betain Komplexes ergab ein K_d Wert von 19 ± 3 μ M, der sich mit bereits publizierten Daten deckte (K_d Wert 17 μ M) (Horn *et al.*, 2006). Die Bindung von DMSP an das gereinigte OpuAC Protein führte zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität während der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz Spektroskopie (siehe Abbildung 21 B und D). Die Bindungsaffinität der apparenten Dissoziationskonstante des OpuAC-DMSP Komplexes ergab einen K_d Wert von 1021 ± 228 μ M, was nahezu identisch mit

dem ermittelten K_i Wert von $912 \pm 275 \mu\text{M}$ beim Transport durch OpuA war (siehe Abbildung 18 B).

Die intrinsische Tyrosinfluoreszenz Spektroskopie mit dem rekombinanten gereinigten OpuCC Protein für Glycin Betain, Carnitin, DMSP und die DMSP Derivate ergab eine Änderung in der Fluoreszenzintensität. Die Bestimmung kinetischer Parameter für den OpuCC-Glycin Betain und OpuCC-DMSP Komplex führte zu biologisch nicht erklärbaren hohen K_d Werten von über $500 \mu\text{M}$ (Daten nicht gezeigt). Die durchgeführten radioaktiven Transportstudien zeigten für Glycin Betain und DMSP hochaffine K_m Werte von $7 \mu\text{M}$ bei Glycin Betain und ein K_i Wert von $39 \mu\text{M}$ bei DMSP (siehe Abbildung 20). Diese Diskrepanz zu den K_d Werten war biologisch nicht erklärbar und ist vermutlich auf die Qualität des rekombinant hergestellten OpuCC Proteins zurückzuführen. Daher wurden in Abbildung 22 lediglich die Änderungen des Fluoreszenzspektrums bei der Bindung mit den verschiedenen kompatiblen Soluten an das rekombinante OpuCC Protein gezeigt. Eine Kalkulation der Dissoziationskonstante des OpuCC-Komplexes mit den verschiedenen kompatiblen Solute war nicht möglich.

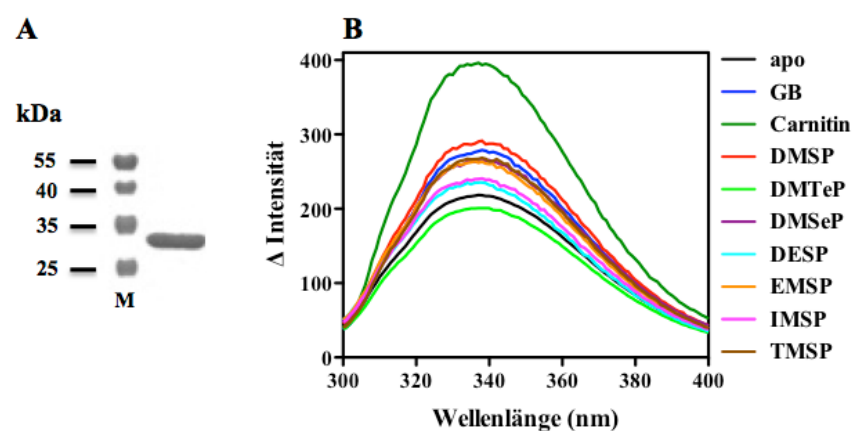


Abbildung 22: Fluoreszenzspektrum vom gereinigten OpuCC Protein mit verschiedenen kompatiblen Soluten. (A) 15 %iges SDS-Gel mit dem gereinigten OpuCC Protein. M = Protein Marker; OpuCC = $5 \mu\text{g}$ gereinigtes OpuCC Protein. (B) Fluoreszenzspektrum vom gereinigten OpuCC Protein ($1 \mu\text{M}$ im Assay) ohne und $1000 \mu\text{M}$ der angegebenen kompatiblen Solute.

Die rekombinanten SBP OpuAC und OpuCC wurden bereits mit mehreren Substraten kristallisiert und die Bindungstasche mit dem gebundenen Substrat im Detail analysiert (Horn *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011). Eine kristallisierte Struktur der SBP mit DMSP lagen nicht zur Verfügung, daher wurden *in silico* Modellierungen von OpuAC und OpuCC mit DMSP angefertigt, um die Bindung von DMSP zu studieren. Für die *in silico* Modellierung wurden verfügbare Kristallisationsstrukturen von OpuAC mit dem Schwefel-

Analoga von Glycin Betain DMSA (PDB Nummer 3CHG) und OpuCC mit Glycin Betain (PDB Nummer 3PPP) verwendet (Smits *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011). Die chemischen Eigenschaften von DMSP für die Studien wurden aus der Kristallisationsstruktur von DMSP mit dem Enzym DddQ im Komplex mit DMSP von *Silicibacter latuscaerulensis* (PDB Nummer 4LA2) entnommen (Li *et al.*, 2014). Die Modellierungen wurden von Herrn Sander Smits (Institut für Biochemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt.

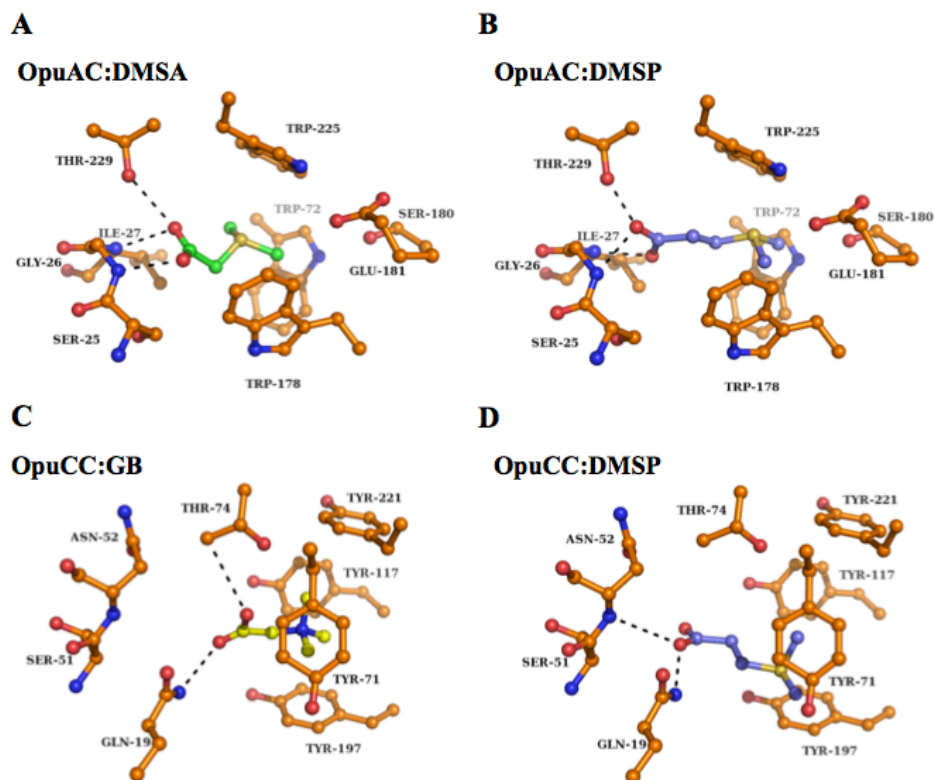


Abbildung 23: *In silico* Bindungsmodell von OpuAC und OpuCC mit DMSP. (A) Koordination des OpuAC-DMSA Komplexes (PDB Nummer 3CHG). (B) *In silico* Modell des OpuAC-DMSP Komplexes. (C) Koordination des OpuCC-Glycin Betain Komplexes (PDB Nummer 3PPP). (D) *In silico* Modell des OpuCC-DMSP Komplexes.

Das OpuAC Protein formte aus drei Seitengruppen der Aminosäure Tryptophan (Trp22, Trp178 und Trp225) den „aromatischen Cage“, der die positiv geladene Kopfgruppe von DMSA über Kationen π -Interaktionen und van der Waals Interaktionen stabilisierte. Die Carboxylgruppe von DMSA interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Stickstoffmolekül im Backbone der Aminosäuren Gly26 und Ile27 (Abbildung 23 A). Von diesem Modell ausgehend wurde DMSA durch DMSP ersetzt und mit der vorhandenen Kristallisationsstruktur OpuAC-DMSA verglichen (PDB Nummer 3CHG). DMSA und

DMSP besaßen ähnliche chemische Strukturen. In Abbildung 23 B ist die berechnete Bindung des OpuAC-DMSP Komplexes gezeigt. Die positiv geladene Dimethylsulfat Kopfgruppe von DMSP lag auch hier im „aromatischen Cage“ und wurde über Kationen π -Interaktionen stabilisiert. DMSP besaß im Gegensatz zu DMSA noch eine weitere CH_2 Gruppe, diese zusätzliche Gruppe sorgte für eine Verschiebung des Schwefelatoms von DMSP innerhalb des „aromatischen Cages“ um 0.7 \AA , dennoch war weiterhin eine Interaktion über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Stickstoffmolekülen der Aminosäuren Gly26 und Ile27 möglich. Die Verschiebung der Dimethylsulfon Kopfgruppe vom DMSP war suboptimal für eine Stabilisierung des Substrates in der aktiven Bindungsseite des OpuAC Proteins, was zu den niedrigaffinen K_m Wert von $912 \text{ }\mu\text{M}$ beim Transport und den K_d Wert von $1021 \text{ }\mu\text{M}$ beim OpuAC - DMSP Komplex führte (siehe Abbildung 18 und 21).

Für das OpuCC Protein waren keine Kristallstrukturen mit einem Schwefel-Betain wie DMSA verfügbar, deswegen wurde die Bindung von DMSP über den verfügbaren OpuCC-Glycin Betain Komplex berechnet (Abbildung 23 C). Bei OpuCC formten vier Tyrosine (Tyr71, Tyr117, Tyr197 und Tyr221) den „aromatischen Cage“, in dem die Trimethylammoniumgruppe von Glycin Betain über Kationen π -Interaktionen stabilisiert wurde. Die aus dem „aromatischen Cage“ herausragende Carboxylgruppe bindete an die Aminosäurereste Gln19 und Thr74. Diese Interaktionen sorgte für eine sehr gute Stabilisierung von Glycin Betain, was sich auch in den hochaffinen K_m Wert von $7 \text{ }\mu\text{M}$ beim Transport durch OpuC widerspiegelt (siehe Abbildung 20). Das *in silico* Modell des OpuCC-DMSP Komplexes ist in Abbildung 23 D gezeigt, dass ähnliche Bindungen von DMSP an OpuCC wie bei Glycin Betain offenbarte. Die positiv geladene Dimethylsulfon Kopfgruppe wurde ebenfalls durch den „aromatischen Cage“ über Kationen π -Interaktionen stabilisiert. Die Carboxylgruppe vom DMSP interagiert ebenfalls mit der Aminosäure Gly19, allerdings nicht mehr mit der Aminosäure Thr74. Die Schwanzgruppe von DMSP ist wesentlich länger als bei Glycin Betain, daher konnte keine Interaktion mehr mit der Aminosäure Thr74 stattfinden, allerdings hatte sich eine neue Interaktion mit der Aminosäure Ser51 etabliert. Diese Aminosäure ist auch an der Bindung von Carnitin beteiligt dessen Kohlenstoffgerüst in seiner Länge dem von DMSP entspricht (Du *et al.*, 2011). Diese räumliche Neubildung der Interaktion mit langen Kohlenstoffketten, wie bei DMSP und Carnitin, schien eine stabile Interaktion der Substrate zu dem OpuCC Protein auszubilden. Dadurch waren die hochaffinen K_i Werte von $39 \text{ }\mu\text{M}$ für DMSP (siehe Abbildung 20) und der hochaffine K_m Wert von $6 \text{ }\mu\text{M}$ für Carnitin nachvollziehbar (siehe Abbildung 34 C).

3.1.7 Bioinformatische Untersuchung über die Verteilung der Transporter OpuA und OpuC in der Gattung *Bacillus*

Die Wachstumsversuche (siehe 3.1.2), Aufnahme Experimente (siehe 3.1.5) und die Bindung an die extrazellulären SBP (siehe 3.1.6) zeigten das DMSP über die OpuA und OpuC Transportsysteme bei *B. subtilis* akkumuliert wurde und infolge dessen die Zelle vor Stress schützten. Über die Verbreitung beider Transportsysteme in der Gattung *Bacillus* ist wenig bekannt, darum wurde eine BLAST-P Analyse mit allen komplett sequenzierten *Bacillus* Stämmen (Integriert in der Integrated Microbial Genomes and Metagenomes Datenbank; Nordberg *et al.*, 2013) durchgeführt. Für die BLAST-P Analyse wurden die bereits bekannten Aminosäure Sequenzen der OpuAC und OpuCC Proteine verwendet (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1999). Die bioinformatische Analyse mit 88 vollständig sequenzierten *Bacillus* Genomen ergab das 84 Stämme eine OpuAC Protein und 84 Stämme ein OpuCC Protein aufwiesen. 82 der analysierten *Bacillus* Stämme wiesen beide Transporter auf und kein *Bacillus* Stamm besaß keinen der beiden Transporter. Ein Vergleich der OpuAC und OpuCC SPB ergab, dass die Aminosäuren für die Ausbildung der charakteristischen aromatischen Bindebox für die Stabilisierung des Substrates über Kationen π -Interaktionen konserviert war (Horn *et al.*, 2006; Smits *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2011). Die analysierten *Bacillus* Stämme sind potenziell in der Lage DMSP, wie im *in Silico* Modell gezeigt, zu binden (siehe Abbildung 23). Die Auflistung der *Bacillus* Stämme kann dem Anhang entnommen werden (siehe 6, Tabelle 11).

3.2 Evolution der OpuB und OpuC Transporters bei *B. subtilis*

In den vorrangenden Experimenten wurde im Detail gezeigt das DMSP durch OpuA und OpuC unter verschiedenen Stressbedingungen akkumuliert werden kann. Dabei stellte sich der OpuC Transporter als besonders effizient bei der Aufnahme der verschiedenen natürlichen und synthetischen kompatiblen Solute heraus. Es war bekannt das OpuC ein sehr breites Substratspektrum besaß, nahezu alle bekannten kompatiblen Solute konnten durch das OpuC Transportsystem ins Zellinnere transportiert werden (siehe Abbildung 8) (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes and Bremer, 1998; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002; Bashir *et al.*, 2014a,b). Der OpuB und OpuC Transporter lagen im Genom bei *B. subtilis* in unmittelbarer Nähe, den ein Transporter ist vermutlich aus einer Genduplikation entstanden (Kappes *et al.*, 1999). Aminosäuresequenz Vergleiche zwischen den vier Komponenten der Transportsysteme zeigten hohe Homologien (83 % OpuBA/OpuCA, 85 % OpuBB/OpuCB, 69 % OpuBC/OpuCC und 85 % OpuBD/OpuCD)

(Kappes *et al.*, 1999). Die Bindung der Substrate wird durch die Bindungsaffinitäten der Substratbindepoteine OpuBC und OpuCC bestimmt, deren Aminosäuresequenz zu 69 % identisch sind, sie sich aber extrem in dem Substratspektrum unterscheiden (Kappes *et al.*, 1999; Berntsson *et al.*, 2010; Eitinger *et al.*, 2010). In Abbildung 24 ist eine BLAST-P Analyse von den OpuBC und OpuCC Protein von *B. subtilis* 168 dargestellt (Integrated Microbial Genomes and Metagenomes Datenbank).

```

B. subtilis 168 OpuBC      CSLPGLSAAADQTIKIGASMSSESEIIASMLGQLIEHHTDLKTTTIKNLGSNAVQQQALM 60
B. subtilis 168 OpuCC      CSLPGLGGASDDTIKIGASMTSESEIVANMIAQLIEHDTDLNTALVKNLGSNYVQHQAAM 60
*****.:*:*:*****:*****.*.:*****.***:*:***** **:*:

B. subtilis 168 OpuBC      NGEIDIAATRITGDAITGTLRMEPEKDPDKALALTQREFKKRYDLKWYDSYGFNTYAFT 120
B. subtilis 168 OpuCC      GGDIDISATRTSTDLTSTLGKEAEKDPKKALNIVQNEFQKRFSYKWFDSYGFNTYAFT 120
*:*:***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

B. subtilis 168 OpuBC      VSKELADQYHLETVSDVKKWAPQLKLGVDNYWMKLGNGYQDFTKTYGMTFGGTYPMQIG 180
B. subtilis 168 OpuCC      VTKKFAEKEHINTVSDLKKNASQYKLGVDNAWLKRGDGYKGFVSTYGFEGTYPMQIG 180
*:*:***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

B. subtilis 168 OpuBC      LVYDAVKSGKMDIVLAISTDGRIKSYGLKMLKDDKQFFPPYDCSPVVEKVLKEHPELEG 240
B. subtilis 168 OpuCC      LVYDAVKNGKMDAVLAISTDGRIKAYDLKILKDDKRFFPPYDCSPVIEKVLKEHPELEG 240
*****.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

B. subtilis 168 OpuBC      IIKKMLGKIDTATMQELNVEVDGNLKEPSVVAKEYLEKHRYFES 284
B. subtilis 168 OpuCC      VINKLIGQIDTETMQELNVEVDGKLKEPSVVAKEFLEKHYYFD- 283
*:*:***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Abbildung 24: Proteinsequenz Alignment der OpuBC und OpuCC Proteine von *B. subtilis*. Dargestellt ist das Aminosäuresequenz Alignment der extrazellulären SBP OpuBC und OpuCC (ohne Signalsequenz) von *B. subtilis* 168. Grün markiert sind die aromatischen Aminosäuren, die den „aromatischen Cage“ für die Stabilisierung der Trimethylgruppen bilden. Grau markiert sind die Aminosäuren die eine Bindung zu den Carboxylgruppen der kompatiblen Solute bilden. Rot (OpuBC) und Blau (OpuCC) sind die Aminosäuren an der Position 74 markiert. Beim OpuB Transporter sitzt an dieser Position ein Asp (D), während beim OpuC Transporter ein Thr (T) vorhanden ist (Pittelkov *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011).

Im Proteinsequenz Alignment sind die Tyrosine (Grün) für den „aromatischen Cage“ und die Aminosäuren die für die Bindung der kompatiblen Solute verantwortlich sind markiert (Grau). Der Sequenzvergleich zeigte, dass die an der Bindung der Substrate beteiligten Aminosäuren fast identisch sind, allerdings gibt es an der Aminosäureposition 74 eine Abweichung. Im roten Kästchen sind die Aminosäuren Asparaginsäure (D) bei OpuBC und die Aminosäure Threonin (T) bei OpuCC hervorgehoben. Kristallisationsstudien von Pittelkov *et al.*, 2011 und Du *et al.*, 2011 offenbarten, dass die Aminosäure an der Position 74 einen wichtigen Einfluss auf die Bindung und Stabilisierung der kompatiblen Solute ausübt, denn eine Veränderung der Aminosäure (Mutagenese) führte zu einer Einschränkung oder zum Verlust der Bindung zu den Substraten. In der Abbildung 25 sind die Strukturen des OpuBC-Cholin, OpuCC-Cholin, OpuCC-Glycin Betain und OpuCC-Carnitin Komplexes dargestellt. Im Fokus der Darstellungen ist die Aminosäure Asp74 im OpuBC Protein und die

Aminosäure Thr74 im OpuCC Protein und ihre Rolle bei der Bindung und Stabilisierung der Substrate in der Bindungstasche.

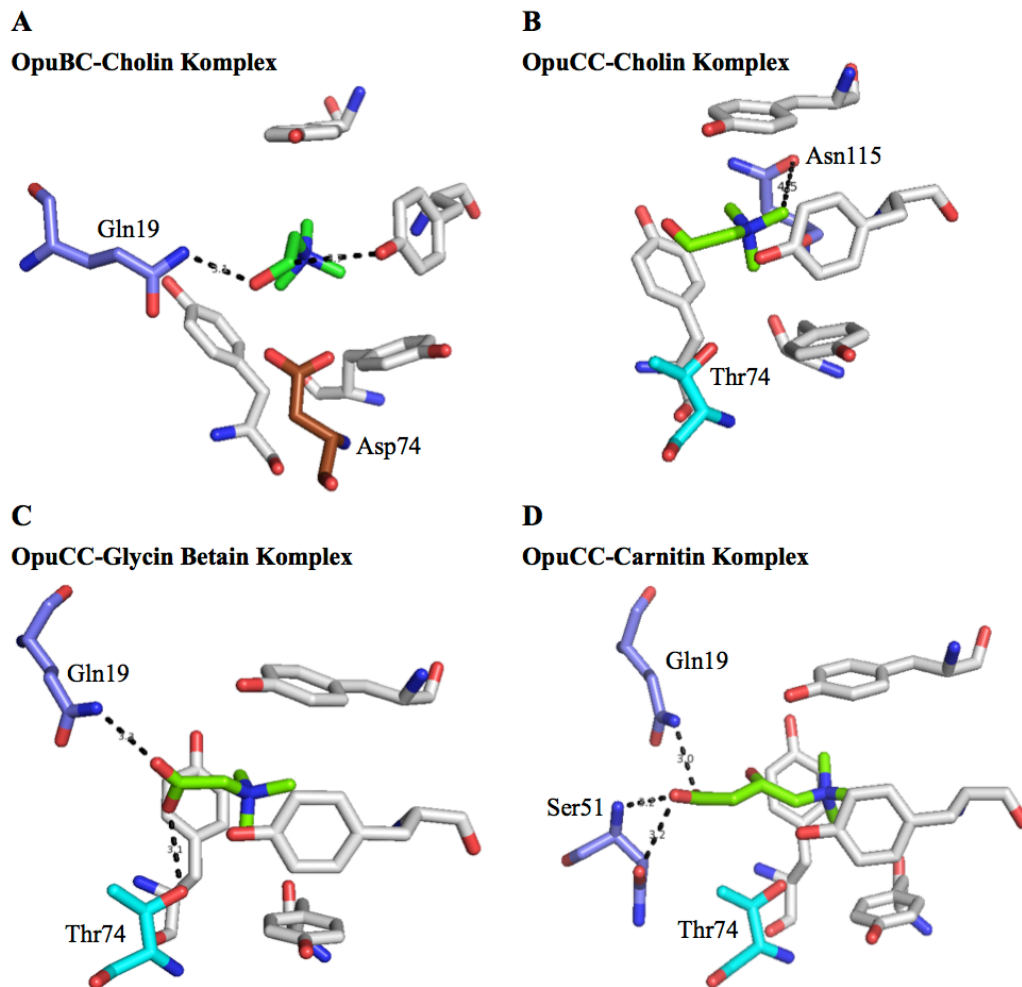


Abbildung 25: Aromatische Bindungstasche des OpuBC und OpuCC Proteins mit verschiedenen kompatiblen Soluten. Im Fokus der Strukturabbildungen lag die Aminosäure Asp74 (OpuBC) und Thr74 (OpuCC), außerdem wurden die Aminosäuren die an der direkten Bindung der Substrate beteiligt sind herausgestellt. (A) Koordination des OpuBC-Cholin Komplexes. (B) Koordination des OpuCC-Cholin Komplexes. (C) Koordination des OpuCC-Glycin Betain Komplexes. (D) Koordination des OpuCC-Carnitin Komplexes. Modifiziert nach Pittelkov *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011.

Die Asparaginsäure (Asp74 in OpuBC) besitzt eine negativ geladene Carboxylgruppe im Aminosäurerest (polare geladene Seitenkette) und kann zu anderen polaren Ladungen eine starke Verbindung aufbauen, außer sie sind gleichartig geladen. Threonin (Thr74 in OpuCC) dagegen besitzt eine Hydroxyethylgruppe als Rest (polare aber ungeladene Seitenkette), die mit anderen polaren Ladungen Bindungen eingehen kann.

Im OpuBC-Cholin Komplex war die Aminosäure Asp74 nicht direkt an der Bindung von Cholin beteiligt (siehe Abbildung 25 A). Die Aminosäure war ein zentraler Bestandteil bei der

Ausbildung eines Wassernetzwerkes, dass die zwei Proteinen Domänen miteinander vernetzte und indirekt für die Stabilisierung von Cholin mitverantwortlich war (siehe Abbildung 10 B) (Pittelkov *et al.*, 2011). Die Aminosäure Asp74 besaß außerdem eine starke negative Ladung die andere negative Ladungen, wie die negativ geladene Carboxylgruppe von Glycin Betain und Carnitin, abstossen konnte und eine Bindung der Substrate damit eventuell verhinderte. Bei den OpuCC-Substrat Komplexen (siehe Abbildung 25 B, C und D) ist die Aminosäure Thr74 nur bei der Bindung von Glycin Betain direkt beteiligt. Allerdings findet hier keine Abstossung der Substrate in der aromatischen Bindungstasche statt und daher konnten die Substrate mit anderen Aminosäuren (Gln19, Ser51 und Asn115) interagieren. In den folgenden Studien wurde die Auswirkung beim Austausch der Aminosäure an der Position 74 untersucht.

3.2.1 Akkumulationsvermögen der Transportermutante OpuB (OpuBC D74D) mit verschiedenen Komptaiblen Soluten bei Salzstress

Mit Mutagenese Experimenten sollte die besondere Bedeutung der Aminosäureposition 74 in den extrazellulären SBP durch ein Austausch von Asp74 in Thr74 beim OpuBC Protein und ein Austausch von Thr74 in Asp74 im OpuCC Protein mit *in vivo* und *in vitro* Versuchen studiert werden.

Für die *in vivo* Experimente wurden die *B. subtilis* Stämme SBB9 (OpuB⁺ D74T) und SBB10 (OpuC⁺ T74D) mit einer zielgerichteten Mutagenese konstruiert (siehe 2.5.4). Auf den pX Derivat Plasmiden pMT9 (natives *opuB* Operon im pX Plasmid) und pChen3 (natives *opuC* Operon im pX Plasmid) wurde die *opuBC* und *opuCC* Sequenz verändert, was zur Folge hatte das nun an der Aminosäureposition 74 sich jetzt ein Thr74 (OpuBC Protein) bzw. ein Asp74 (OpuCC Protein) befand. Bei den konstruierten Stämmen wurde das native *opuB* und *opuC* Operon als Einzelkopie in die *amyE* Seite durch doppelte homologe Rekombination fest ins Genom von *B. subtilis* integriert, während alle anderen natürlichen Opu Transporter deletiert waren (OpuA, OpuB, OpuC und OpuD). Bei den Kontrollstämmen SBB6 (JH642 pX), SBB7 (OpuB⁺ pX) und SBB8 (OpuC⁺ pX) wurde das leere pX Plasmid (Kim *et al.*, 1996) in die *amyE* Seite von *B. subtilis* integriert.

Mit einem Western Blot wurde zunächst nachgewiesen, dass die extrazellulären SBP vom Wildtyp OpuBC und der OpuBC Mutante beide stabil und im selben maße exprimiert wurden. Die *B. subtilis* Stämme SBB6 (Wildtyp Stamm JH642 pX), SBB7 (OpuB⁺ pX), SBB8 (OpuC⁺ pX) und SBB9 (OpuB⁺ D74T) wurden in SMM bis zu einer OD₅₇₈ 0.5 kultiviert. Daraufhin folgte ein 0.4 M Salzschock für 60 Minuten und die Entnahme von 1 ml Aliquotes für den Western Blot (siehe 2.6.8).

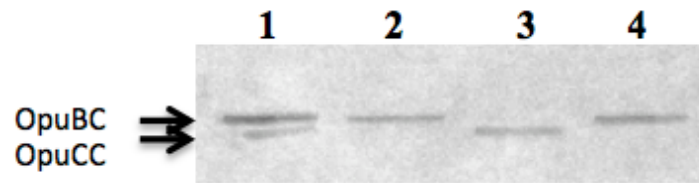


Abbildung 26: Western Blot nach einem Salzschock mit der OpuB Transportermutante. Die *B. subtilis* Stämme SBB6 (Wildtyp Stamm JH642 pX), SBB7 (OpuB⁺ pX), SBB8 (OpuC⁺ pX) und SBB9 (OpuB⁺ D74T) wurden in SMM bis zu einer OD₅₇₈ 0.5 kultiviert und mit 0.4 M Salz für 60 Minuten geschockt. 1 ml Aliquotes wurden für ein Western Blot abgenommen. Der 1. Antikörper war OpuBC, der an das OpuBC und OpuCC Protein bindet. Detektiert wurde der 1. Antikörper mit dem Antikörper AP Donkey Anti-Rabbit IgH, der eine Alkaline Phosphatase besitzt. 1: JH642 pX; 2: OpuB⁺ pX; 3: OpuC⁺ pX; 4: OpuB⁺ (D74T).

Mit dem Western Blot wurde sichergestellt, dass der Aminosäureaustausch sich nicht auf die Stabilität des OpuBC (D74T) Proteins auswirkte. Außerdem zeigte er keine Veränderung der Expression des *opuB* Operons nach der Integration in die *amyE* Seite von *B. subtilis*.

Anschließend wurden physiologische Wachstumsversuche unter Salzstress mit dem *B. subtilis* Stamm SBB9 (OpuB⁺ D74T) durchgeführt. Der *B. subtilis* Stamm SBB7 (OpuB⁺ pX) und SBB9 (OpuB⁺ D74T) wurde in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit von kompatiblen Soluten inkubiert (Endkonzentration 200 µM).

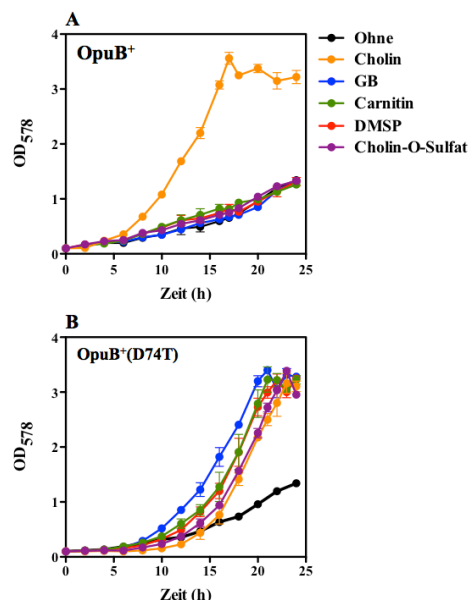


Abbildung 27: Protektion von *B. subtilis* Transportermutanten bei Salzstress. (A) Der *B. subtilis* Stamm SBB7 (OpuB⁺ pX) wurde in in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute kultiviert. (B) Der *B. subtilis* Stamm SBB9 (OpuB⁺ D74T) wurde ebenfalls in in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute kultiviert.

Die Wachstumskurve des *B. subtilis* Stammes SBB7 (OpuB⁺ pX) zeigte das nur Cholin die Zellen bei 1.2 M Salzstress protektieren konnte (Abbildung 27 A). Wurden die Zellen mit anderen kompatiblen Soluten kultiviert, konnte kein Wachstum beobachtet werden. Mit Cholin wurde die volle Protektion nach 16 Stunden erreicht. Beim *B. subtilis* Stamm SBB9 (OpuB⁺ D74T) konnten alle verwendeten kompatiblen Solute die Zellen unter Hochsalz schützen (Abbildung 27 B). Der Aminosäure Austausch einer einzelnen Aminosäure im OpuBC Protein hat dafür gesorgt, dass sich das Substratspektrum erweitert hat. Nicht nur Cholin kann exklusiv akkumuliert werden, sondern jetzt auch weitere kompatible Solute. Allerdings wurde die volle Protektion der Zellen durch das mutierten OpuB Transportsystems erst nach 21 bis 24 Stunden erreicht, auch mit Cholin.

Die Wachstumskurven zeigten, dass die Änderung der Aminosäure (D74T) im OpuBC Protein das Substratspektrum erweitert hat. In einem weiteren Wachstumsversuch unter Salzstress wurde das komplette Set an verfügbaren kompatiblen Soluten eingesetzt, um zu testen welche Solute noch akkumuliert werden konnten.

Der *B. subtilis* Stamm SBB6 (JH642 pX), SBB7 (OpuB⁺ pX) und SBB9 (OpuB⁺ D74T) wurden in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von kompatiblen Soluten (Endkonzentration von 75, 200 und 1000 µM) kultiviert und das Wachstum nach 18 Stunden photometrisch bestimmt (OD₅₇₈).

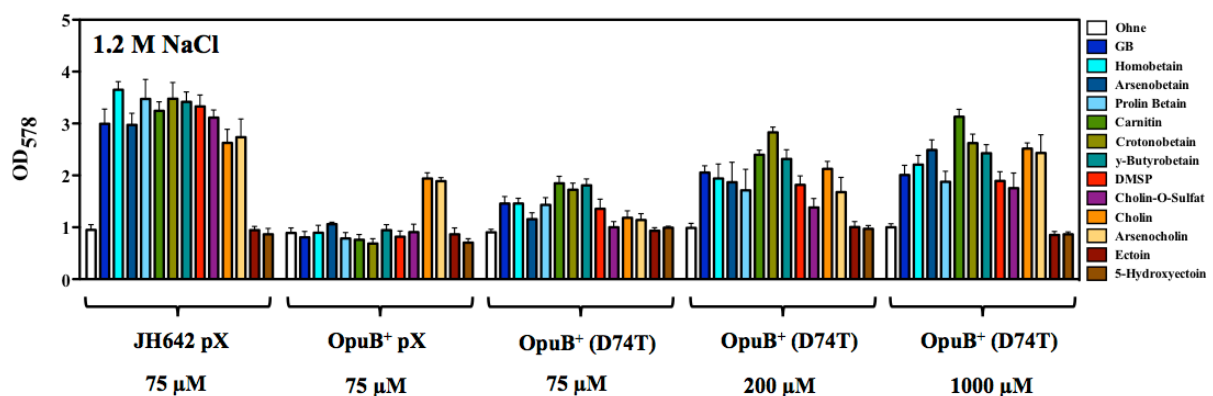


Abbildung 28: Protektion der OpuB Transportermutante mit verschiedenen kompatiblen Soluten bei Salzstress. Die *B. subtilis* Stämme SBB6 (JH642 pX), SBB7 (OpuB⁺ pX) und SBB9 (OpuB⁺ D74T) wurde in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute kultiviert (Endkonzentrationen 75 – 1000 µM). Das Wachstum wurde nach 18 Stunden photometrisch bestimmt (OD₅₇₈). Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Der Wachstumsversuch unter 1.2 M NaCl zeigte nach 18 Stunden, dass alle kompatiblen Solute (Endkonzentration 75 µM) eine volle Protektion im Wildtyp Stamm JH642

gewährleisten (OD_{578} 2.8 bis 3.9), mit Ausnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin. Im SBB7 Stamm ($OpuB^+$) wurde wie erwartet nur ein Wachstum bei Cholin und Arsenocholin (Endkonzentration 75 μM) beobachtet (OD_{578} 2.1 bis 2.4). Im Gegensatz zum SBB7 Stamm ($OpuB^+$) konnte beim mutierten $OpuB$ Transporterstamm ein Wachstum mit allen kompatiblen Soluten festgestellt werden, außer bei Ectoin und 5-Hydroxyectoin. Bei niedrigen Konzentration an kompatiblen Soluten wurde moderates Wachstum beobachtet (OD_{578} 1.3 bis 2) und erst hohe Konzentration von 1000 μM an kompatiblen Soluten erlaubten volle Protektion der Zellen unter den hochosmolaren Bedingungen (OD_{578} 2.2 bis 3.5).

Durch ein einzigen Aminosäureaustausch konnte das Substratspektrum des $OpuB$ Transporters erweitert werden. Allerdings wurde mit der Mutation auch die Aufnahme von Cholin verschlechtert, was sich im verminderten Wachstum der Transportermutante widerspiegelt (siehe Abbildung 27 B und 28).

3.2.2 Kinetische Parameter bei der Aufnahme verschiedener kompatibler Solute der $OpuB$ ($OpuBC$ D74T) Transportermutante

Die Wachstumsversuche unter Salzstress mit der $OpuB$ (D74T) Mutante konnten eindrucksvoll zeigen, dass sich das Substratspektrum des $OpuB$ System in Richtung $OpuC$ System entwickelt hat, denn nun konnten alle verfügbaren kompatiblen Solute aufgenommen werden. Das Substratspektrum hat sich erweitert, scheint aber nicht so effektiv wie beim natürlichen $OpuC$ Transportsystem zu sein. Um das mutierte $OpuB$ (D74) Transportsystem im Detail zu studieren, wurden Transport Experimente mit radioaktiv markierten [$1-C^{14}$]-Glycin Betain, ^{14}C markierten Cholin und L-Carnitin durchgeführt. Die Aufnahme der Substanzen folgte einer Michaelis-Menten Kinetik, dadurch konnte die Kinetischen Parameter des Transportvorganges kalkuliert werden. Zusätzlich wurden die kinetischen Parameter für DMSP und Cholin-O-Sulfat über eine kompetitive Inhibition ermittelt. Die *B. subtilis* Stämme SBB7 ($OpuB^+$ pX) und SBB9 ($OpuB^+$ D74T) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert und für ein radioaktiven Transport Assay eingesetzt (siehe 2.4.4).

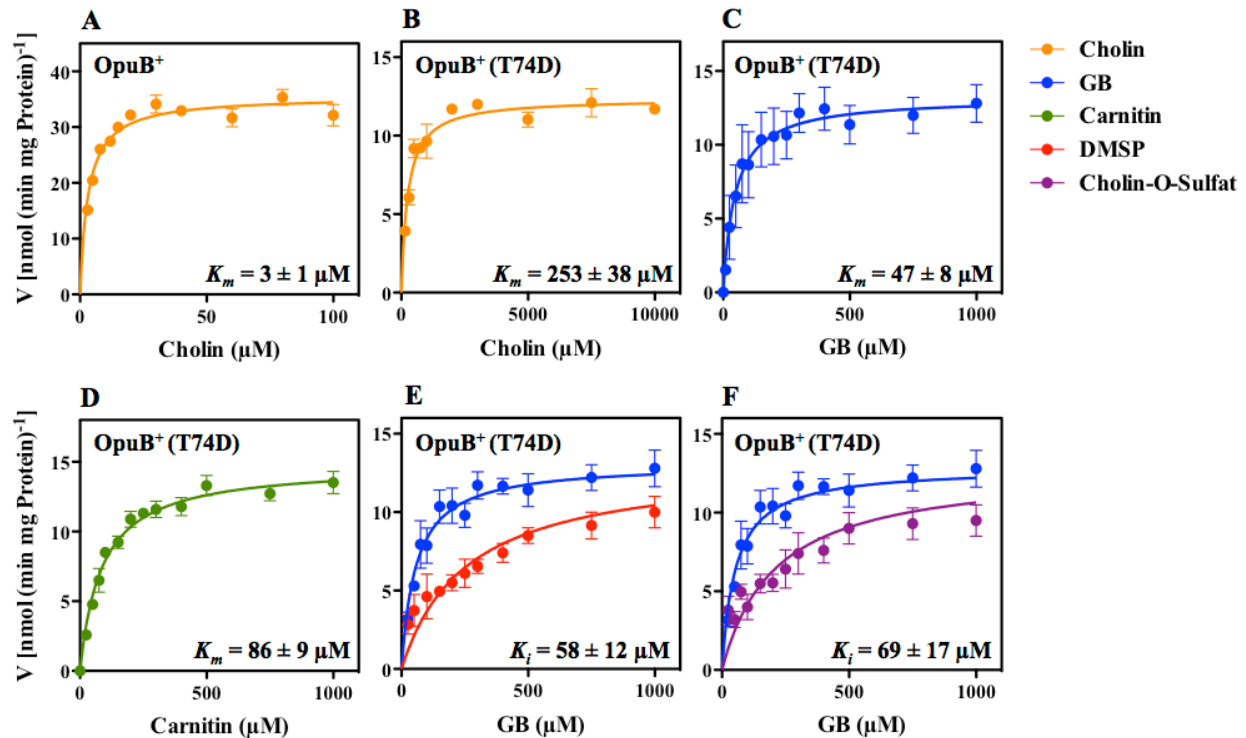


Abbildung 29: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiven kompatiblen Solute durch die OpuB Transportermutante. Michaelis-Menten Kinetik der Aufnahme von $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Glycin Betain, ^{14}C markierten Cholin und L-Carnitin und von der kompetitiven Inhibition vom $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain Transport bei der Anwesenheit von $300\text{ }\mu\text{M}$ der angegebenen kompatiblen Solute (Konzentrationen des Substrates im Assay von $10\text{ - }10000\text{ }\mu\text{M}$). Dargestellt sind die Experimente aus zwei unabhängigen Kulturen und Transport Assays mit Standardabweichung.

Die kinetischen Parameter bei den Aufnahme Experimenten mit dem Wildtyp Transporter OpuB mit Cholin und der OpuB Transportermutante (OpuB D74T) mit Glycin Betain, Cholin und Carnitin wurden in Abbildung 29 dargestellt. Außerdem wurden die kinetischen Parameter bei der Aufnahme von $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin Betain mit $300\text{ }\mu\text{M}$ DMSO und Cholin-O-Sulfat als Inhibitor bei der OpuB Transportermutante kalkuliert (kompetitive Inhibition). Für den Wildtyp OpuB Transporter wurde ein K_m Wert von $3 \pm 1\text{ }\mu\text{M}$ und eine V_{max} von $35 \pm 1\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg pro Protein}^{-1}$ für Cholin ermittelt, diese Kalkulation der kinetischen Parameter stimmte mit bereits publizierten Werten überein (K_m Wert $1\text{ }\mu\text{M}$ und eine V_{max} von $21\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg pro Protein}^{-1}$) (Kappes *et al.*, 1999). Der Transport von Cholin hat sich bei der OpuB (D74T) Mutante dramatisch verringert. Für Cholin wurde ein K_m Wert von $253 \pm 38\text{ }\mu\text{M}$ und eine V_{max} von $13 \pm 1\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg pro Protein}^{-1}$ bestimmt. Diese Verschlechterung des Transportes konnte bereits in den Wachstumsversuchen beobachtet werden (siehe Abbildung 27 B und 28). Die Aufnahme der weiteren kompatiblen Solute ergaben recht gute K_m und K_i Werte die zwischen 47 und $86\text{ }\mu\text{M}$ lagen. Die kinetischen Parameter wurden in Tabelle 10 für die verschiedenen kompatiblen Solute zusammengefasst. Wie bereits beim Cholin Transport

waren die Transportgeschwindigkeiten mit einer V_{max} von 13 bis 15 nmol min⁻¹ mg pro Protein⁻¹ sehr gering. Die Transportgeschwindigkeit hat sich bei der OpuB (D74T) Mutante gegenüber dem Wildtyp OpuB Transportsystem um das 2.5 fache verringert.

Die Transport Experimente zeigten eine moderate Affinität der kompatiblen Solute zum mutierten OpuB Transporter (D74T), der allerdings gegenüber dem Transport von Cholin im Wildtyp OpuB Transporter stark verringert war. Dennoch ist die Transportleistung ausreichend für eine Akkumulation von kompatiblen Soluten um osmotisch gestresste *B. subtilis* Zellen zu schützen (siehe Abbildung 27 B und 28).

3.2.3 Bindungsaffinitäten des extrazellulären SBP OpuBC (Wildtyp) und OpuBC (D74T)

Wie für jeden Transport ist die Bindung an das extrazelluläre SBP der Opu Transportsysteme von entscheidender Bedeutung, deswegen wurden die Bindungsaffinitäten des OpuBC (D74T) Proteins mit fünf kompatiblen Soluten über eine intrinsische Tyrosinfluoreszenz Spektroskopie bestimmt (siehe 2.6.6) und mit dem Wildtyp OpuBC Protein verglichen. Pittelkov *et al.*, 2011 konnten beim Wildtyp OpuBC Protein einen K_d Wert von 30 µM für Cholin feststellen, während bei anderen kompatiblen Soluten keine Änderung im Emissionsspektrum detektiert wurde (Pittelkov *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2011).

Die Überexpressionsplasmide pMP31 (Wildtyp OpuBC) und pMB55 (OpuBC D74T) wurden in *E. coli* Zellen überexprimiert (siehe 2.6.3) und anschließend über eine Affinitätschromatographie und über ein Ionenaustausch gereinigt (2.6.4). Die gereinigten Proteine wurden für intrinsischen Tyrosinfluoreszenz Spektroskopie Experimente eingesetzt (1 µM Protein) und die kinetischen Parameter der Bindung zu fünf kompatiblen Soluten ermittelt (siehe 2.6.6).

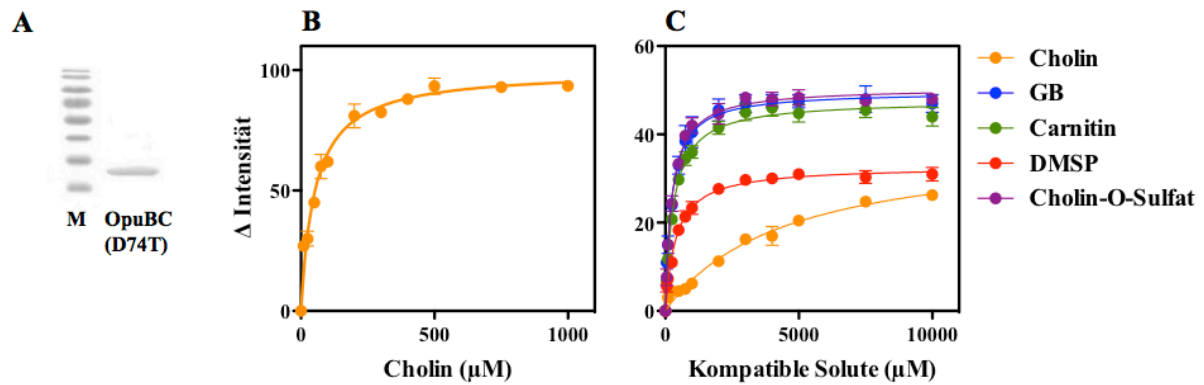


Abbildung 30: Michaelis-Menten Kinetik bei der Bindungsaffinität von verschiedenen kompatiblen Soluten zu OpuBC (D74T). (A) 15 %iges SDS-Gel vom gereinigten OpuBC (D74T) Protein. M = Protein Marker; OpuBC (D74T) = 5 μg gereinigtes OpuBC (D74T) Protein. (B) Kinetik der Bindungsaffinität von OpuBC Wildtyp (1 μM im Assay) zu Cholin über eine intrinsische Tryptophanfluoreszenz Spektroskopie. Die Bindung von Cholin resultierte in einer Änderung der Fluoreszenzintensität. (C) Kinetik der Bindungsaffinität von OpuBC (T74D) (1 μM im Assay) zu den angegebenen kompatiblen Soluten über eine intrinsische Tryptophanfluoreszenz Spektroskopie. Die Bindung der kompatiblen Solute resultierte in einer Änderung der Fluoreszenzintensität. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die Bindung von Cholin an das rekombinante gereinigte Wildtyp OpuBC Protein führte zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität bei der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz Spektroskopie. Die Berechnung der apparenten Dissoziationskonstante des OpuBC-Cholin Komplexes ergab einen K_d Wert von $52 \pm 5 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 30 B). Die Bindung der fünf angegebenen kompatiblen Solute an das rekombinante gereinigte OpuBC (D74T) Protein ergaben ebenfalls Änderungen der Fluoreszenzintensität bei der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz Spektroskopie. Die Kalkulation der apparenten Dissoziationskonstanten der verschiedenen kompatiblen Solute beim OpuBC (D74T) Protein wurden in Tabelle 10 zusammengefasst. Für Cholin wurde beim mutierten OpuBC Protein eine drastische Reduzierung der Dissoziationskonstante kalkuliert (4000 μM), während sie bei den weiteren vier kompatiblen Soluten zwischen 246 bis 397 μM betrug.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiven Substanzen und die Bindungsaffinitäten verschiedener kompatibler Solute im mutierten OpuB Transportsystem.

| Kompatible Solute | Wildtyp OpuB | | OpuB (D74T) | |
|-------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------|
| | K_m / K_i Werte (μM) ^a | K_d Werte (μM) | K_m / K_i Werte (μM) ^b | K_d Werte (μM) |
| Cholin | 3 ± 1 | 52 ± 5 | 253 ± 38 | 4000 ± 300 |
| Glycin Betain | - | - | 47 ± 8 | 300 ± 33 |
| Carnitin | - | - | 86 ± 9 | 305 ± 25 |
| DMSP | - | - | 58 ± 12 | 397 ± 36 |
| Cholin-O-Sulfat | - | - | 69 ± 17 | 246 ± 18 |

Zusammenfassung der kinetischen Parameter des mutierten OpuB Transportsystem im Vergleich zum Wildtyp OpuB Transporter (siehe 3.2.2 und 3.2.3).

a Die Transportgeschwindigkeit betrug bei der Aufnahme von Cholin V_{max} von $35 \pm 1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg pro Protein}^{-1}$.

b Die Transportgeschwindigkeit betrug bei der Aufnahme von Cholin, Glycin Betain und Carnitin V_{max} von 13 - 15 $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg pro Protein}^{-1}$.

Die Kalkulierten K_m bzw. K_i Werte der fünf kompatiblen Solute unterschieden sich von den ermittelten K_d Werten des OpuBC Proteins erheblich.

3.2.4 Kristallisation des OpuBC (D74T) Proteins mit verschiedenen Substraten und Auflösung der Bindungsstrukturen bei der Substratbindung

Um die Bindung der fünf Substrate in der Bindungstasche des mutierten OpuBC Proteins aufzuklären wurden Kristallstrukturanalysen mit dem extrazellulären OpuBC (D74T) Protein durchgeführt. Mit solchen Kristallstrukturanalysen konnten wichtige Bindungsmotive und die für die Bindung der Substrate verantwortlichen Aminosäuren ermittelt werden. Das Überexpressionsplasmid pMB55 (OpuBC D74T) wurde in *E. coli* Zellen überexprimiert (siehe 2.6.3), anschließend über eine Affinitätschromatographie und über ein Ionenaustausch gereinigt (2.6.4) und für Kristallisationsexperimente eingesetzt (siehe 2.6.7). Die Kristallisation des Proteins mit den verschiedenen Substraten wurde von Herrn Sander Smits (Institut für Biochemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt und resultierte in in OpuBC (D74T)-Substrat Komplexen mit einer sehr hohen Auflösung ($< 2.0 \text{ \AA}$), in der auch Wassermoleküle aufgelöst wurden.

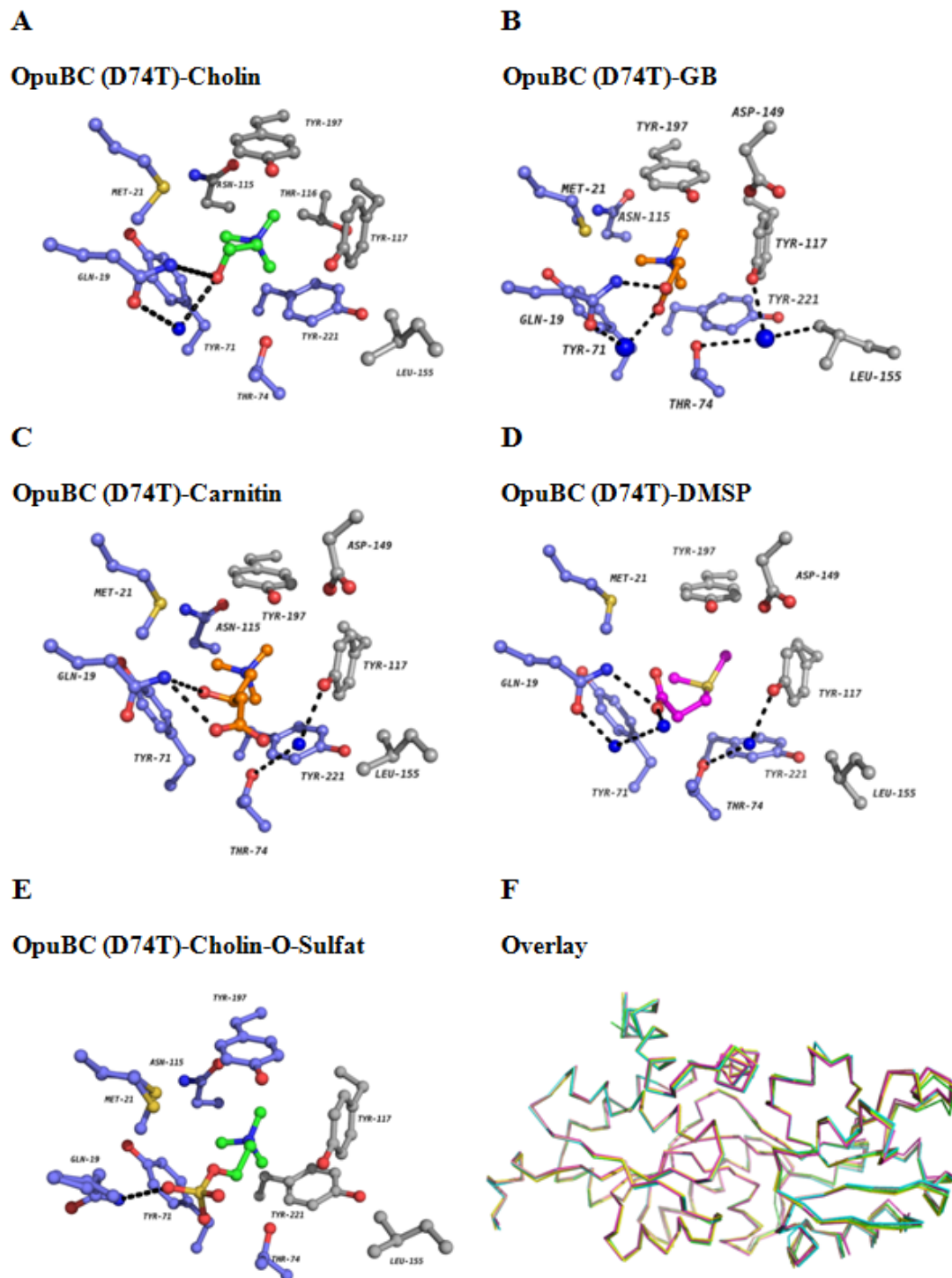


Abbildung 31: Kristallstrukturen der Bindungstasche des OpuBC (D74T) Proteins mit verschiedenen kompatiblen Soluten. (A) Koordination des OpuBC (D74T)-Cholin Komplexes. (B) Koordination des OpuBC (D74T)-Glycin Betain Komplexes. (C) Koordination des OpuBC (D74T)-Carnitin Komplexes. (D) Koordination des OpuBC (D74T)-DMSP Komplexes. (E) Koordination des OpuBC (D74T)-Cholin-O-Sulfat Komplexes. (F) Übersicht des gesamten Proteins bei der Bindung mit den verschiedenen kompatiblen Soluten (Overlay).

Ein typisches Merkmal für die Bindung der extrazellulären SBP der Opu Transporter ist die Stabilisierung der positiven Kopfgruppe der kompatiblen Solute über ein „aromatischen Cage“ (Berntson *et al.*, 2011). Bei OpuBC wird dieser „aromatischen Cage“ aus vier

Tyrosinen gebildet (Tyr71, Tyr117; Tyr197 und Tyr221). Dieses Motiv war auch bei der Stabilisierung der fünf kompatiblen Solute beim OpuBC (D74T) Protein vorhanden. Die positiv geladene Trimethylammoniumgruppe (Cholin, Glycin Betain, Carnitin und Cholin-O-Sulfat) und die Dimethylsulfangruppe von DMSP wurden über Kationen π -Interaktionen von dem „aromatischen Cage“ stabilisiert. Im folgenden wurden die OpuBC (D74T) Kristallstrukturen mit den verschiedenen Liganden beschrieben.

(A) OpuBC (D74T)-Cholin Komplex:

Cholin wurde über eine direkte Interaktion der Carboxylgruppe mit der Aminosäure Gln19 gebunden. Außerdem war die Aminosäure Gln19 zusätzlich indirekt über ein Wassernetzwerk an der Stabilisierung der Hydroxylgruppe beteiligt. Das Wassernetzwerk das ursprünglich über die Aminosäuren Asp74, Tyr117 und Leu155 ausgebildet wurde, eine Verbindung des Proteins von Domäne I und II, ist verlorengegangen. Diese neue Verbindung war suboptimal für eine Stabilisierung von Cholin, das sich in einer 84.3 fache Verschlechterung bei der Aufnahme von C^{14} radiaktiv markierten Cholin widerspiegelte (siehe Abbildung 29 B).

(B) OpuBC (D74T)-Glycin Betain Komplex:

Wie bei Cholin wurde die Carboxylgruppe von Glycin Betain direkt und indirekt über die Aminosäure Gln19 stabilisiert. Diese Verbindung lag ebenfalls bei OpuCC mit Glycin Betain vor. Ein Wassernetzwerk über die Aminosäuren Thr74, Tyr117 und Leu155 wurde wie beim Wildtyp OpuBC Protein ausgebildet, das allerdings durch den Austausch der Aminosäure Asp74 zu Thr74 flexibel geworden ist und es erlaubt das Glycin Betain in die aromatische Bindungstasche gelangen und gebunden werden konnte.

(C) OpuBC (D74T)-Carnitin Komplex:

Carnitin besitzt eine lange Kohlenstoffkette mit einer zusätzlichen Methylgruppe innerhalb dieser Kohlenstoffkette. Wie bei Cholin und Glycin Betain nahm die Aminosäure Gln19 über zwei direkte Verbindungen mit Carnitin eine wichtige Stellung in der Interaktion und Stabilisierung des Substrates in der aromatischen Bindungstasche ein. Hier hatte sich neben einer Bindung der Carboxylgruppe von Carnitin eine Bindung an die Methylgruppe innerhalb der Kohlenstoffkette herausgebildet. Ein Wassernetzwerk über die Aminosäuren Thr74 (Domäne I) und Tyr177 (Domäne II) agierte als indirekte Stabilisierungshilfe für Carnitin. Eine Interaktion wie beim OpuCC Protein über die Aminosäure Ser51 wurde nicht ausgebildet (siehe Abbildung 25 D).

(D) OpuBC (D74T)-DMSP Komplex:

Wie Carnitin besitzt DMSP eine lange Kohlenstoffkette, allerdings keine weitere Methylgruppe innerhalb dieser Kette. Die negativ geladene Carboxylgruppe von DMSP

wurde wie vorher bei Cholin und Glycin Betain direkt und indirekt über die Aminosäure Gln19 stabilisiert. Ein Wassernetzwerk wie bei Carnitin über die Aminosäuren Thr74 (Domäne I) und Tyr177 (Domäne II) spielte auch bei DMSP für die Stabilisierung eine wichtige Rolle.

(E) OpuBC (D74T)-Cholin-O-Sulfat Komplex:

Cholin-O-Sulfat besitzt eine negativ geladene Sulfatgruppe und unterscheidet sich hier von allen anderen untersuchten kompatiblen Soluten. Eine Bindung des Substrates wurde ebenfalls über eine direkte Bindung über die Aminosäure Gln19 ausgebildet.

(F) In der Overlay Übersicht des OpuBC (D74T) SBP mit den gebundenen kompatiblen Solute zeigte sich keine gravierende Änderung der Gesamtstruktur bei der Bindung der Substrate.

Die Analyse der Kristallstrukturen ergab, dass die Aminosäure Gln19 bei allen Bindungen der Substrate an das Protein direkt oder indirekt beteiligt ist. Im mutagenisierten OpuBC (D74T) Protein sorgten Interaktionen der Substrate an diese Aminosäure für eine Stabilisierung der gebundenen Form des SPB.

3.2.5 Auswirkung auf die Akkumulation verschiedener kompatibler Solute bei der OpuC (OpuCC T74D) Transportermutante

Der OpuB Transporter, der natürlicherweise nur Cholin transportiert, konnte durch den Austausch einer einzigen Aminosäure dahingehend evolviert werden, dass nun ein breites Spektrum an kompatiblen Soluten akkumuliert werden konnte. Die Experimente zeigten eine Evolution des OpuB Transporters hin zum Substratprofil des OpuC Transportsystems, allerdings war die Transportleistung verringert. Nun fragte ich mich ob die Evolution des OpuC Transporters auch hin zum OpuB Transporter möglich ist. Du *et al.*, 2011 konnten zeigen das der Aminosäure Austausch von Thr74 zu Asp74 im extrazellulären OpuCC Protein dazu führt, das keine kompatiblen Solute, mit Ausnahme von Cholin, eine Änderung des Emissionsspektrums hervorrufen. Bei diesen intrinsischen Tyrosinfluoreszenz Spektroskopie Experimenten wurden keine kinetischen Parameter publiziert. Die vorliegenden Daten wurden ausschließlich mit gereinigten rekombinanten OpuCC (T74D) Protein von Du *et al.*, 2011 angefertigt (*in vitro*). Publierte Daten mit dem kompletten OpuC Transportsystem in *B. subtilis* lagen nicht vor (*in vivo* Experimente). Wie die radioaktiven Transport Versuche der OpuB (D74T) Transportermutante und die Berechnung der Bindungsaffinitäten beim OpuB (D74T) Protein gezeigt haben, können diese kinetischen Parameter deutlich voneinander abweichen (siehe Tabelle 10).

Die folgenden Wachstums- und Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markierten kompatiblen Soluten wurden mit dem konstruierten *B. subtilis* Stamm SBB10 (OpuC^+ T74D) durchgeführt (siehe 2.5.4 und 3.2.1).

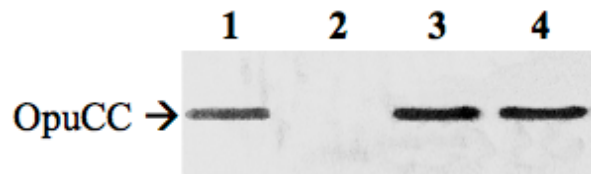


Abbildung 32: Western Blot nach einem Salzschock mit der OpuC Transportermutante. Die *B. subtilis* Stämme SBB6 (Wildtyp Stamm JH642 pX), SBB7 (OpuB^+ pX), SBB8 (OpuC^+ pX) und SBB10 (OpuC^+ T74D) wurden in SMM bis zu einer OD_{578} 0.5 kultiviert und mit 0.4 M Salz für 60 Minuten geschockt. 1 ml Aliquotes wurden für ein Western Blot abgenommen. Der 1. Antikörper war OpuCC, der an das OpuCC Protein bindet. Detektiert wurde der 1. Antikörper mit dem Antikörper AP Donkey Anti-Rabbit IgH, der eine Alkaline Phosphatase besitzt. 1: JH642 pX; 2: OpuB^+ pX; 3: OpuC^+ pX; 4: OpuC^+ (T74D).

Mit einem Western Blot wurde überprüft, dass der Aminosäureaustausch sich nicht auf die Stabilität des OpuCC (T74D) Proteins auswirkte und die Expression des *opuC* Operons nach Integration in die *amyE* Seite von *B. subtilis* nicht beeinflusst wurde.

Die *B. subtilis* Stämme SBB6 (Wildtyp Stamm JH642 pX), SBB8 (OpuC^+ pX) und SBB10 (OpuC^+ T74D) wurden in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von kompatiblen Soluten (Endkonzentration von 75, 200 und 1000 μM) kultiviert und das Wachstum nach 18 Stunden photometrisch bestimmt (OD_{578}).

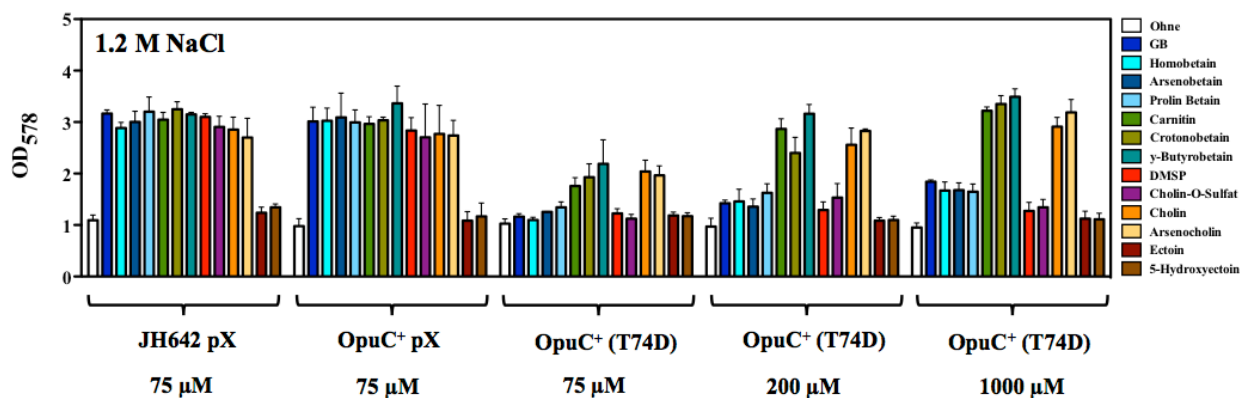


Abbildung 33: Protektion der OpuC Transportermutante mit verschiedenen kompatiblen Soluten bei Salzstress. Die *B. subtilis* Stämme SBB6 (JH642 pX), SBB8 (OpuB^+ pX) und SBB10 (OpuB^+ D74T) wurde in in SMM mit 1.2 M NaCl (37 °C, 220 rpm) ohne und mit der Anwesenheit verschiedener kompatibler Solute kultiviert (Endkonzentrationen 75 – 1000 μM). Das Wachstum wurde nach 18 Stunden photometrisch bestimmt (OD_{578}). Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Beim Wildtyp Stamm *B. subtilis* JH642 und beim SBB8 Stamm (OpuC⁺ pX) konnten wie erwartet mit allen kompatiblen Soluten (Endkonzentration 75 µM), mit Ausnahme von Ectoin und 5-Hydroxyectoin, ein gutes Wachstum der Zellen bei hohen Osmolaritäten beobachtet werden (OD₅₇₈ 2.9 bis 3.7). Selbst niedrige Konzentrationen der kompatiblen Solute konnten für einen ausreichenden Schutz der Zellen bei diesem Salzstress Wachstumsversuch sorgen. Beim *B. subtilis* Stamm SBB10 (OpuC⁺ T74D) wurde bei geringen Konzentrationen an kompatiblen Soluten (75 µM) nur ein Wachstum bei Carnitin und Cholin festgestellt bzw. bei den Derivaten der beiden kompatiblen Solute (OD 1.8 bis 2.8). Nur durch Konzentrationen von 1000 µM der angegebenden kompatiblen Solute konnte ein leichtes Wachstum bei Glycin Betain und seinen Derivaten, DMSP und Cholin-O-Sulfat beobachtet werden (OD₅₇₈ 1.6 bis 2).

Der Aminosäure Austausch im OpuCC Protein (T74D) hat somit für einen dramatischen Einbruch der Protektion der Zellen im Salzstress Wachstumsversuch gesorgt. Die kompatiblen Solute Glycin Betain (Glycin Betain Derivate), DMSP und Cholin-O-Sulfat konnten nur in hohen Konzentrationen leichtes Wachstum bei den Zellen herbeiführen. Diese kompatiblen Solute sind normalerweise für ihre ausgezeichneten protektiven Eigenschaften bekannt (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Bremer, 2002). Der mutierte OpuC Transporter konnte demzufolge die Substanzen nicht mehr genügend akkumulieren um einen Schutz aufzubauen. Dagegen wurde die Akkumulation von Carnitin und Cholin, sowie deren Derivaten, kaum beeinflusst. Allerdings wurde die volle Protektion erst bei 200 µM an kompatiblen Soluten gewährleistet (OD 2.8 bis 3.5).

3.2.6 Kinetische Parameter bei der Aufnahme ausgewählter kompatibler Solute der OpuC (OpuCC T74D) Transportermutante

Die Wachstumsexperimente mit der OpuC Transporter Mutante haben gezeigt, dass sich das Substratspektrum nicht verändert hat. Allerdings zeigten die Experimente eine reduzierte Akkumulation von kompatiblen Soluten um ein Zellwachstum bei hohen Osmolaritäten zu gewährleisten. Eine vollständige Protektion wurde nur erreicht wenn die kompatiblen Solute in hohen Konzentrationen zur Verfügung standen (siehe Abbildung 33). Um die wohl veränderten kinetischen Parameter, im Vergleich zum Wildtyp OpuC Transporter, aufzuklären wurden abermals mit radioaktiv markierten Glycin Betain, markierten Cholin und L-Carnitin Transport Experimente durchgeführt. Die *B. subtilis* Stämme SBB8 (OpuC⁺ pX) und SBB10 (OpuC⁺ T74D) wurden in SMM mit 0.4 M NaCl kultiviert (37 °C, 220 rpm) und für die radioaktiven Transport Experimente eingesetzt (siehe 2.4.4).

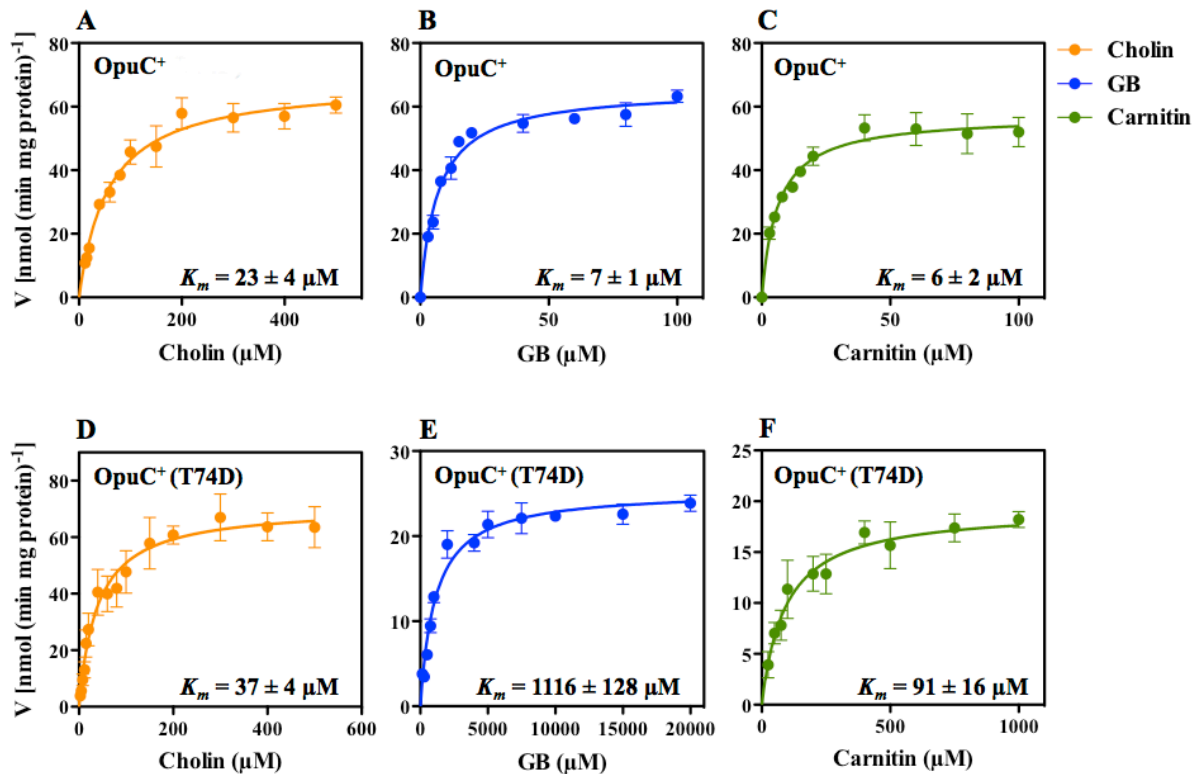


Abbildung 34: Michaelis-Menten Kinetik bei der Aufnahme von radioaktiven kompatiblen Soluten durch die OpuC Transportermutante. Michaelis-Menten Kinetik der Aufnahme von [1- 14 C]-Glycin Betain, 14 C markierten Cholin und L-Carnitin (Konzentrationen des Substrates im Assay von 3 - 20000 μ M). Dargestellt sind die Experimente aus zwei unabhängigen Kulturen und Transport Assays mit Standardabweichung.

Die kinetischen Parameter bei den radioaktiven Transport Experimenten im Wilttyp OpuC Transportsystem (siehe Abbildung 34 A, B und C) und im OpuC (T74D) Transportsystem (Abbildung 34 D, E und F) mit [1- 14 C] Glycin Betain, 14 C markierten Cholin und L-Carnitin wurden über eine Michaelis-Menten Kinetik kalkuliert. Beim Wilttyp OpuC Transporter sind K_m Werte zwischen 6 und 23 μ M berechnet worden. Wie die K_m Werte decken sich die V_{max} Werte von 66 ± 2 nmol min $^{-1}$ mg pro Protein $^{-1}$ bei Glycin Betain, 58 ± 3 nmol min $^{-1}$ mg pro Protein $^{-1}$ bei Carnitin und 76 ± 3 nmol min $^{-1}$ mg pro Protein $^{-1}$ bei Cholin mit bereits publizierten kinetischen Parametern ($V_{max} \sim 65$ nmol min $^{-1}$ mg pro Protein $^{-1}$) (Kappes *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1998; Kappes *et al.*, 1999). Durch den Aminosäure Austausch im OpuCC Protein verringerte sich bei Glycin Betain der K_m Wert um das 186 fache (K_m Wert 1116 ± 128). Die Transportgeschwindigkeit von 66 ± 2 nmol min $^{-1}$ mg pro Protein $^{-1}$ verringerte sich um das 2.5 fache (V_{max} 26 ± 1 nmol min $^{-1}$ mg pro Protein $^{-1}$). Auch der K_m Wert und V_{max} Wert für Carnitin (K_m Wert 91 ± 16 ; V_{max} 20 ± 1 nmol min $^{-1}$ mg pro Protein $^{-1}$) wurde um das 15 fache bzw. um das 2.9 fache verringert. Im Gegensatz zu den kompatiblen Soluten Glycin Betain und Carnitin wurden die kinetischen Parameter für den Cholin Transport nicht in Mitleidenschaft durch den Aminosäure Austausch gezogen. Die kalkulierten kinetischen

Parameter für den Cholin Transport durch das mutierte OpuC Transportsystem sind nahezu identisch (K_m Wert 37 ± 4 ; V_{max} 71 ± 3 nmol min⁻¹ mg pro Protein⁻¹).

3.2.7 Bioinformatische Analyse der OpuBC und OpuCC SBP in der Gattung *Bacillus*

Wie bei 3.1.7 bereits für die Transporter OpuA und OpuC gezeigt wurde, sind die Opu Transporter in nahezu allen *Bacillus* Species vertreten. In der folgenden bioinformatischen Analyse wurden die Aminosäuresequenzen der extrazellulären OpuBC und OpuCC Proteine über ein BLAST-P in der Gattung *Bacillus* analysiert. Für die Analyse wurden ausschließlich komplett Sequenzierte *Bacillus* Genome verwendet (84 Genome integriert in der Integrated Microbial Genomes and Metagenomes Datenbank, der National Center for Biotechnology Information Datenbank und der SILVA High Quality Ribosomal RNA Database).

Bei der Analyse wurden die Homologien der gesamten Aminosäuresequenz betrachtet und die Aminosäure an der Position 74. Über den Homologievergleich und der Aminosäure (D bei OpuBC und T bei OpuCC) konnte bestimmt werden um welchen Opu Transporter es sich handelte. Außerdem wurden die Aminosäuren für die Ausbildung des charakteristischen „aromatischen Cages“ und die Aminosäuren die an der Interaktion direkt oder indirekt mit dem Substrat beteiligt sind analysiert (Pittelkov *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011).

84 *Bacillus* Genome (23 Arten) wurden nach den ebend genannten Kriterien analysiert. Die überwiegende Anzahl der *Bacillus* Arten (16 von 23) besaßen ein OpuC Transporter, während die restlichen *Bacilli* ein OpuB und OpuC Transporter besaßen. Sind beide Transporter vorhanden liegen deren Gene in unmittelbarer Nachbarschaft auf dem Genom. Jediglich die *Bacillus* Stämme *B. cellulosilyticus* N-4, *B. cytotoxicus* NVH 391-98 und *B. halodurans* C-125 besitzen keinen der zwei Transporter. Die aromatischen Aminosäuren die den „aromatischen Cage“ bilden waren in allen 81 *Bacillus* Stämmen konserviert, bei wenigen Stämmen ist lediglich das Tyrosin durch ein Phenylalanin ersetzt (z. B. bei *B. infantis* NRRL-14911). Das detaillierte Alignment und das Gencluster der SBP kann dem Anhang entnommen werden (siehe 6).

3.2.8 Stammbaum der Gattung *Bacillus*

Wie die bioinformatische Untersuchung der Gattung *Bacillus* gezeigt hat, sind überwiegend die OpuC Transportertypen vertreten und nur eine kleine Gruppe von *Bacillus* Stämmen besitzen ein OpuB Transporter, allerdings nur zusammen mit einem OpuC Transporter. Bei einem 16s rRNA Stammbaum der Gattung *Bacillus* wurde die Verteilung der Transporter bestimmt.

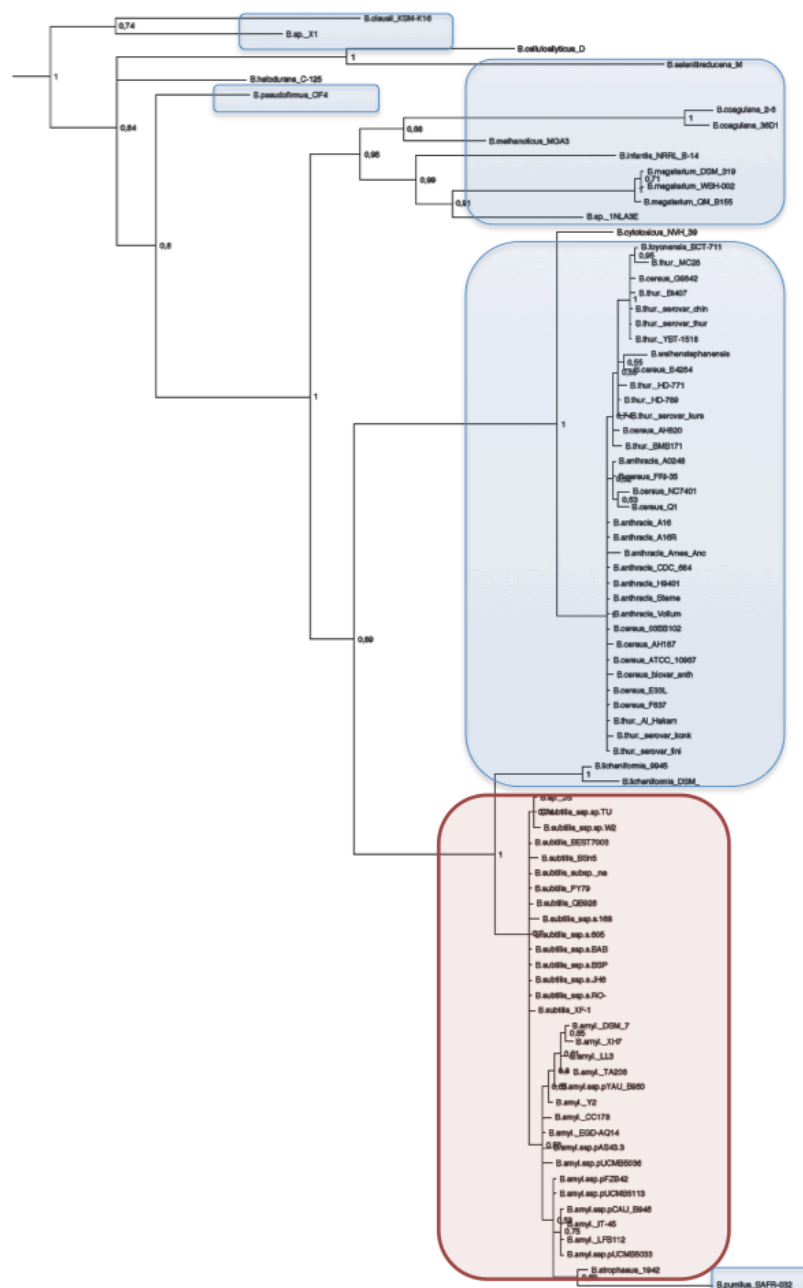


Abbildung 35: 16s rRNA Stammbaum der Gattung *Bacillus*. Aus der Gattung *Bacillus* wurde mit 84 Stämmen (komplett Sequenzierte Genome) ein 16s rRNA Stammbaum der Phylogenie erstellt. Die überwiegende Anzahl an *Bacillus* Stämmen wies ein OpuC Transporter auf und nur eine kleine Gruppe besaß ein OpuB als auch ein OpuC Transporter. Blau markiert sind *Bacillus* Stämme die ein OpuC Transporter besitzen. Rot sind die *Bacillus* Stämme markiert, die beide Transporter besitzen.

In einem 16s rRNA Stammbaum der Gattung *Bacillus* wurde die Phylogenie mit der Sequenzanalyse der extrazellulären SBP des OpuB und OpuC Transporters verknüpft. Der Stammbaum gibt Auskunft darüber welcher Transporter zuerst vorhanden war und welcher aus einer Genduplikation entstanden sein muss. Der OpuB Transporter ist aus dem OpuC Transporter entstanden. Eine kleine Gruppe von 4 *Bacillus* Arten (*B. amyloliquefaciens*, *B.*

atrophaeus 1942, *B. sp.* JS und *B. subtilis* Stämme) besitzen beide Transporter (Rot), während die restlichen nur OpuC Transportertypen besitzen (Blau).

4. Diskussion

Das ubiquitär vorkommende Bodenbakterium *B. subtilis* ist in der Lage DMSP aus seiner Umwelt zu akkumulieren, kann es aber nicht als Nährstoffquelle nutzen. DMSP wird unter verschiedenen Stressbedingungen hauptsächlich durch den ABC Transporter OpuC aufgenommen und ist im gleichen Umfang protektiv wie Glycin Betain. Natürliche und synthetische DMSP Derivate, bei denen die Dimethylsulfat Gruppe chemisch modifiziert wurde, gelangen ebenfalls durch den OpuC Transporter ins Zellinnere und zeigten unter hochosmotischen Bedingungen protektive Eigenschaften. DMSP ermöglichte außerdem ein Wachstum von *B. subtilis* an seinen äußersten Temperaturgrenzen (13 °C und 52 °C).

Das OpuC Transportsystem wurde als Haupttransporter für die Aufnahme von DMSP und seinen Derivaten identifiziert. Neben OpuC existiert in *B. subtilis* der hoch homologe Transporter OpuB. Es ist bekannt, dass OpuC ein breites Substratprofil besitzt (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes and Bremer, 1998; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002; Hoffmann and Bremer, 2011, Bashir *et al.*, 2014a,b), jedoch transportiert der eng verwandte OpuB Transporter nur Cholin (Kappes *et al.*, 1999; Pittelkov *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure im extrazellulären SBP OpuBC das Transportsystem in Richtung OpuC evolviert werden kann. Umgekehrt führte die Mutagenese der entsprechenden Aminosäure im OpuCC Bindeprotein hin zum OpuBC Bindeprotein zu einer stark eingeschränkten Akkumulation der kompatiblen Solute.

4.1 Stressprotektion bei *B. subtilis* durch das ökologisch reichlich vorkommende DMSP und seinen natürlichen und synthetischen Derivaten

Die tertiäre Sulfoniumverbindung DMSP wird in hohen intrazellulären Konzentrationen von marinen Makroalgen, dem Phytoplankten und einigen Landpflanzen hergestellt (Challenger and Simpson, 1948; Green, 1964; Barnard *et al.*, 1984; Hanson *et al.*, 1994; Yoch, 2002; Otte *et al.*, 2004; Curson *et al.*, 2011a; Reisch *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012; Rainia *et al.*, 2013) und spielt eine wichtige Rolle im weltweiten Schwefelkreislauf (Carlson *et al.*, 1987; Kiene *et al.*, 2000). Nachdem DMSP durch Lyse oder virale Infektion ins Meerwasser gelangt ist (Stefels, 2000; Curson *et al.*, 2011a; Reisch *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012; Hehemann *et al.*, 2014) kann es von Mikroorganismen aufgenommen werden und als Osmolyt oder Schwefel-

und Kohlenstoffquelle genutzt werden (Karsten *et al.*, 1992; Kiene *et al.*, 1999; Welsh, 2000; Sunda *et al.*, 2002; Todd *et al.*, 2007; Curson *et al.*, 2011a,b; Rinta-Kanto *et al.*, 2011; 2012; Levine *et al.*, 2012; Todd *et al.*, 2012; Murdock *et al.*, 2014). Mitglieder der Gattung *Bacillus* sind in der Natur in sämtlichen Habitaten zu finden (Earl *et al.*, 2008; Logan and De Vos, 2009). Ihr Vorkommen ist nicht nur auf Landökosysteme beschränkt, sondern weitet sich auf Marine- und Flussmündungsökosysteme aus (Siefert *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2008; Ettoumi *et al.*, 2013). Es ist davon auszugehen das *B. subtilis* in diesen Habitaten Zugang zu DMSP hat, allerdings ist über die ökologische Rolle von DMSP für *B. subtilis* nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde der Frage nach der Aufnahme und Katabolisierung von DMSP im Modellorganismus *B. subtilis* nachgegangen.

B. subtilis kann eine Vielzahl unterschiedlicher kompatibler Solute aus der Umwelt unter hochosmolaren Bedingungen akkumulieren und so sein Wachstum gewährleisten (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes and Bremer, 1998; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002; Bashir *et al.*, 2014a,b). Bei Wachstumsexperimenten unter hohen osmotischen Bedingungen wurde *B. subtilis* durch DMSP, sein natürliches Selen Derivat DMSeP und fünf weitere synthetische DMSP Derivate (Dickschat *et al.*, 2010; Brock *et al.*, 2014) protektiert und Wachstum ermöglicht, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz (siehe Abbildung 14 A). Besonders DMSP schützte die Zellen bei Salzstress mit gleicher Effektivität wie Glycin Betain, ein sehr gutes kompatibles Solut, das in der Natur häufig vorkommt (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Yancey, 2005). DMSP wird von *B. subtilis* nicht katabolisiert (siehe Abbildung 12) und gehört dadurch zu den Mikroorganismen, die DMSP nur als kompatibles Solut nutzen.

4.1.1 Das kompatible Solute DMSP als „chemisches Chaperon“

Osmotisch gestresste *B. subtilis* Zellen besitzen durch die Akkumulation von externen oder *de novo* synthetisierten kompatiblen Soluten einen Wachstumsvorteil. Dieser Vorteil beruht auf den folgenden Eigenschaften der kompatiblen Solute. Sie stabilisieren unter osmotischen Bedingungen den Zellturgor und beeinflussen damit den Ionenhaushalt. Ebenso stabilisieren die kompatiblen Solute die native Konformation von Proteinen und gewährleisten die Integrität verschiedener Zellkomponenten während biosynthetischen Prozessen (Cayley *et al.*, 1992; Bourot *et al.*, 2000; Bremer and Krämer, 2000; Doamant *et al.*, 2001; Ignatova and Gierasch, 2006; Street *et al.*, 2010; Auton *et al.*, 2011; Wood, 2011). Die physikalischen und chemischen Eigenschaften individueller kompatibler Solute sind ein wichtiger Faktor für die protektiven Eigenschaften dieser Substanzen (Street *et al.*, 2010; Auton *et al.*, 2011; Jackson-Atogi *et al.*, 2013). Zum Beispiel offenbarte Ectoin unter verschiedenen Stressbedingungen

ausgezeichnete protektive Eigenschaften (Lippert and Galinski, 1992; Widderich *et al.*, 2014), allerdings wurde mit dem Oxidationsprodukt 5-Hydroxyectoin ein besserer Schutz von Molekülen bei Austrocknung gewährleistet als bei Ectoin (Bursy *et al.*, 2007; Tanne *et al.*, 2007). Ebenso wurden unterschiedliche Effekte mit Glycin Betain oder Prolin auf den Kaliumgehalt, Glutamathaushalt, Trehalosehaushalt und auf den osmotischen Druck im Zytoplasma in *E. coli* K-12 beobachtet (Cayley *et al.*, 1992). Unterschiedliche zelluläre Effekte und protektive Eigenschaften zeigten sich auch beim Vergleich von DMSP und seinen Derivaten im Wachstum von *B. subtilis* unter hoch osmolaren Bedingungen (siehe Abbildung 14 A), bei der osmostress-adaptiven Prolinbiosynthese (siehe Abbildung 15) und bei der Repression der Promotoraktivität des osmotisch induzierten *opuA* Operons (siehe Tabelle 9). Neben der Protektion bei Salzstress konnten ebenfalls bei Kälte- und Hitzestress (13 °C und 52 °C) eine Protektion durch DMSP, seinem natürlichen Selen Derivat DMSeP (nur bei Kälte) und einem synthetischen Derivat EMSP (nur bei Kälte) beobachtet werden (siehe Abbildung 14 B und C). Die zelluläre Protektion unter niedrigen und hohen Wachstumstemperaturen ist für viele Mikroorganismen gezeigt worden (Auflistung verschiedener Referenzen bei Holtmann and Bremer, 2004, Hoffmann and Bremer, 2011), allerdings ist über den molekularen Mechanismus wenig bekannt. Studien in *B. subtilis* bei Kälte und Hitze mit Glycin Betain, in denen die intrazelluläre Glycin Betain Konzentration kalkuliert wurde, zeigten eine verringerte Akkumulation von Glycin Betain gegenüber osmotischen Stressbedingungen (Holtmann and Bremer, 2004, Hoffmann and Bremer, 2011; Hoffmann *et al.*, 2013). Diese Beobachtungen zeigten, dass die Mechanismen der Temperaturprotektion durch Glycin Betain sich von denen der Osmoprotektion unterscheiden. An den Temperaturgrenzen, bei denen gerade noch Wachstum möglich ist, spielen bei *B. subtilis* die SigB-kontrollierte generelle Stressantwort, Kälteschock und Hitzeschock Chaperone eine wichtige Rolle, denn in der Kälte können Proteine ihre Flexibilität verlieren und sind besonders durch die Bildung von Eiskristallen gefährdet, während bei hohen Temperaturen eine Hitzedenaturierung der Proteine droht (Graumann *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1999; Jaenicke, 1999; Bayles and Wilkinson, 2000; Beckering *et al.*, 2002; Schuhmann *et al.*, 2002; Weber and Marahiel, 2002; Brigulla *et al.*, 2003; Versteeg *et al.*, 2003; Holtmann *et al.*, 2004; Budde *et al.*, 2006; Bursy *et al.*, 2008; Strocchi *et al.*, 2008; Cybulski *et al.*, 2010; Elsholz *et al.*, 2010; Martin and de Mendoza, 2013; Runde *et al.*, 2014). Wird *B. subtilis* bei Temperaturen kultiviert, bei denen kaum noch Wachstum stattfindet (13 °C oder 52 °C) versagen diese Mechanismen, während die Zugabe von DMSP Wachstum ermöglicht.

Verschiedene Studien zeigen, *in vivo* und *in vitro*, dass kompatible Solute Proteine stabilisieren können und damit die native Konformation des Proteins aufrechterhalten (Lippert and Galinski, 1992; Diamant *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 2004; Street *et al.*, 2006; Pastor *et al.*, 2010; Murdock *et al.*, 2014). Sie wirken als „chemisches Chaperon“ (Diamant *et al.*, 2011) und auch DMSP zeigt Eigenschaften solcher Substanzen. Protein stabilisierende Eigenschaften konnten für DMSP bereits *in vitro* bei Denaturierungsexperimenten mit der Phosphofructokinase aus Hasenmuskulatur und der kältesensitiven Malat Dehydrogenase der Polaralge *Acrosiphonia arcta* beobachtet werden (Nishiguchi and Somero, 1992; Kartsen *et al.*, 1996).

Mit den hitzeprotektiven Fähigkeiten von DMSP in *B. subtilis* konnte den protektiven Eigenschaften der Substanz eine neue Facette hinzugefügt werden. Hitzeschutz konnte bereits für verschiedene andere kompatible Solute gezeigt werden (Caldas *et al.*, 1999; Diamant *et al.*, 2011; Holtmann and Bremer, 2004; Chattopadhyay *et al.*, 2004; Tschapek *et al.*, 2011).

4.1.2 Aufnahme von DMSP durch die OpuA und OpuC Transportsysteme

In seinen Habitaten stehen *B. subtilis* viele unterschiedliche kompatible Solute zur Verfügung, die unter Stressbedingungen akkumuliert werden können. Für die Aufnahme der verschiedenen kompatiblen Solute besitzt *B. subtilis* ein Set an osmotisch induzierbaren Transportern (OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE) (Kappes *et al.*, 1996; Kappes *et al.*, 1999; Bremer, 2002). Mit einem definierten Set an Transportermutanten wurden für die DMSP Aufnahme in *B. subtilis* die ABC Transporter OpuA und OpuC identifiziert. Weiter wurde gezeigt, dass das natürliche DMSP Derivat DMSeP und die fünf synthetischen Derivate nur durch den OpuC Transporter aufgenommen werden (siehe Abbildung 16). Die Aufnahme von DMSP über die Transporter OpuA und OpuC erfolgte bei Salz-, Kälte- und Hitzestress (Siehe Abbildung 16 und 17). Die DMSP Aufnahme, besonders in marinen Ökosystemen, steht in Konkurrenz zu der Aufnahme von Glycin Betain (Kiene *et al.*, 1998; Vila-Costa *et al.*, 2006). In mikrobiellen Transportsystemen wird DMSP sowie Glycin Betain über dieselben Transporter aufgenommen (Gouesbet *et al.*, 1994; Cosquer *et al.*, 1999; Murdock *et al.*, 2014). *B. subtilis* bildet dabei keine Ausnahme, denn die OpuA und OpuC Transporter sind hochspezifische Transporter für Glycin Betain (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996). Allerdings ist zu vermerken, dass der Glycin Betain Transporter OpuD nicht an der Aufnahme von DMSP beteiligt ist (Kappes *et al.*, 1996). Der OpuD Transporter gehört zur Familie der BCCT Transporter (Saier *et al.*, 1999; Ziegler *et al.*, 2010). Interessanterweise wurde bereits ein Transporter der BCCT Familie (DddT) als DMSP Aufnahmesystem aus einem DMSP-katabolisierenden Mikroorganismus beschrieben. Wurde

der DddT-Transporter heterolog in *E. coli* exprimiert, transportierte er neben DMSP auch Glycin Betain (Todd *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012).

Die Aufnahme von DMSP konnte bereits für die Gattung *Roseobacter* (Malmstrom *et al.*, 2004), für Cyanobakterien wie *Synechococcus* oder *Prochlorococcus* (Malmstrom *et al.*, 2005; Vila-Costa *et al.*, 2006), für *Listeria monocytogenes* (Bayles and Wilkinson, 2000), für *E. coli* (Cosquer *et al.*, 1999), für *Ensifer meliloti* (Pichereau *et al.*, 1998) und für *Pseudomonas doudoroffii* (Yoch *et al.*, 1997) dokumentiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die quantitativen Parameter für die Aufnahme von DMSP sowie für das natürliche Selen Derivat DMSeP über die spezifischen ABC Transportsysteme in *B. subtilis* erhoben. In *B. subtilis* präsentierte sich der OpuA Transporter als ein niedrig affiner Transporter für DMSP (K_i Wert um 1 mM) (siehe Abbildung 18). Der ABC Transporter OpuC dagegen stellte sich als hochaffin für DMSP und die DMSP Derivate heraus (K_i Werte 18 bis 39 μ M) (siehe Abbildung 20). Natürlicherweise liegt freies DMSP in den marinen Ökosystemen nur in niedrigen Konzentrationen vor (Kiene *et al.*, 1998; Vila-Costa *et al.*, 2006). Daraus schlussfolgere ich, dass der OpuC Transporter der Haupttransporter für die DMSP Aufnahme ist.

Eine bioinformatische Analyse über die Verbreitung der OpuA und OpuC Transportsysteme in der Gattung *Bacillus* (88 komplett sequenzierte Genome) offenbarte, dass 84 Stämme einen OpuA Transporter, 84 Stämme einen OpuC Transporter und 82 von 88 Stämmen beide Transporter besitzen. Bei der Adaption der Gattung *Bacillus* an unterschiedliche Umweltbedingungen scheint DMSP eine große Relevanz einzunehmen, denn alle *Bacilli* sind potenziell in der Lage DMSP aufzunehmen und als kompatibles Solute zu nutzen.

4.1.3 Die Bindung von DMSP an die extrazellulären SBP OpuAC und OpuCC

Die kompatiblen Solute werden bei *B. subtilis* von den extrazellulären SBP gebunden bevor sie über die Membrankomponenten des Transporters ins Zellinnere transportiert werden können (Kappes *et al.*, 1999; Berntsson *et al.*, 2010; Eitinger *et al.*, 2010). Die kinetischen Parameter der Bindungsaffinität von DMSP zum OpuAC Protein war mit einer berechneten apparenten Dissoziationskonstante von ca. 1 mM sehr schlecht (siehe Abbildung 21 D). Das *in silico* Bindungsmodell des OpuAC-DMSP Komplexes zeigte eine Verschiebung von DMSP innerhalb der aromatischen Bindungstasche um 0.7 Å (im Vergleich mit Glycin Betain). Diese Verschiebung sorgte für keine optimale Stabilisierung von DMSP (siehe Abbildung 23 B). Bei DMSeP und DMTeP wurde das Schwefelatom ersetzt, wodurch sich die Atomradien von 103 pm (Schwefelatom vom DMSP) auf 117 pm (Selenatom bei DMSeP)

und 135 pm (Telluratom im DMTeP) vergrößert haben. Bei EMSP, DESP, IMSP und TMSP wurde das Schwefelatom nicht ersetzt, allerdings sind weitere chemische Gruppen (z. B. Methylgruppen) an die Dimethylsulfatgruppe katalysiert worden (siehe Abbildung 13). Diese Modifizierungen sorgten vermutlich dafür, dass die Derivate nicht mehr von dem „aromatischen Cage“ im OpuAC Bindeprotein über Kationen π -Interaktionen stabilisiert werden konnten. Die apparente Dissoziationskonstante des OpuCC-DMSP Komplexes konnte nicht bestimmt werden, was vermutlich auf eine verminderte Qualität des rekombinanten OpuCC Proteins zurückzuführen war. Das rekombinante OpuCC Protein könnte in anderen Überexpressions Systemen exprimiert werden, z. B. in *Bacillus megaterium* (Hueck *et al.*, 1995; Malten *et al.*, 2006) oder in *Saccharomyces cerevisiae* (Buckholz *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2012), um ein stabileres Protein zu erhalten. Als Alternative zur Fluoreszenzspektroskopie könnten die Affinitäten auch mit ITC (Isothermal titration calorimetry) oder Biacore bestimmt werden. Das *in silico* Bindungsmodell des OpuCC-DMSP Komplex zeigte eine Stabilisierung der positiv geladenen Dimethylsulfatgruppe in der aromatischen Bindungstasche über Kationen π -Interaktionen und die direkte Interaktion mit den Aminosäuren Gly19 und Ser51. Die Architektur der OpuCC Bindungstasche zeichnet sich durch eine strukturelle Flexibilität aus, die es erlaubt auch langkettige kompatible Solute wie das DMSP durch Ausbildung einer neuen Interaktion des Substrates mit der Aminosäure Ser51 zu binden (Du *et al.*, 2011). Die Flexibilität der Bindungstasche des OpuCC Proteins erlaubt die Erkennung vieler unterschiedlicher Substrate und daher war es nicht verwunderlich, dass auch chemische Veränderungen wie bei den DMSP Derivaten eine Bindung an das OpuCC Protein ermöglichten. Diese Flexibilität wurde bereits bei der OpuC vermittelten Aufnahme des toxischen Glycin Betain Derivates (2-(Dimethyl (4-nitrobenzyl) Ammonio) Acetat) bei dem eine Benzol Gruppe anstatt einer Methylgruppe vorhanden war in *B. subtilis* gezeigt (Cosquer *et al.*, 2004).

4.2 Evolution des OpuB Transporters

Der OpuC Transporter aus *B. subtilis* ist ein bemerkenswerter Importer für Osmolyte, denn das Substratspektrum für kompatible Solute, die transportiert werden, ist extrem breit (Kempf and Bremer, 1995; Kappes *et al.*, 1996; Kappes and Bremer, 1998; Nau-Wagner *et al.*, 1999; Bremer, 2002; Hoffmann and Bremer, 2011, Bashir *et al.*, 2014a,b). Kappes *et al.*, 1999 konnte über Sequenzvergleiche eine nahe Verwandtschaft von OpuC zum OpuB Transporter feststellen (69 - 85 % der Transporterkomponenten sind homolog). Im Gegensatz zum OpuC Transporter vermittelt der OpuB Transporter ausschließlich den Transport von Cholin und Cholin Derivaten (z. B. Arsenocholin). Obwohl die beiden Transporter große Homologien in

ihren Sequenzen aufweisen, unterscheiden sie sich erheblich in ihrem Substratprofil (siehe Abbildung 8). Die beiden entsprechenden Operons liegen im *B. subtilis* Genom in unmittelbarer Nachbarschaft und sind vermutlich aus einer Gendublikation entstanden (Kappes *et al.*, 1999). Zwischen den *opuB* und *opuC* Operons liegen Kannibalismus Gene (Ellermeier *et al.*, 2006). Genduplikationen sind wesentliche Antriebsfedern der Evolution, wodurch funktionell neue Gene entstehen können (Long and Langley, 1993; Chen *et al.*, 1997; Thomson *et al.*, 2000). Mit dem Erwerb neuer Gene können sich Organismen an ändernde Umweltbedingungen anpassen und neu erworbene Gene können sich so im Laufe der Evolution etablieren (Nam *et al.*, 2011; Shou *et al.*, 2011). Bei Pflanzen kommen solche Ereignisse von Gendublikationen und Genamplifikationen sehr häufig vor. Bei Dhaliwal *et al.*, 2014 wurden Orthologien bei dem Auxin Transporter ABCB1 zwischen Monokotyledonen (Einkeimblättrige Pflanzen) und Dikotyledonen (Zweikeimblättrige Pflanzen) identifiziert. Der Transporter ist für die Auxin Akkumulation verantwortlich, der ein wichtiger Wachstumsfaktor bei Pflanzen darstellt (Noh *et al.*, 2001; Geisler *et al.*, 2005). Die Entstehung neuer Eigenschaften von Enzymen in Lebensgemeinschaften konnte auch bei *Pseudomonas putida* beobachtet werden (de las Heras and de Lorenzo, 2011; Galvão *et al.*, 2007). Aminosäure Änderungen im XylR Regulator ändert seine Spezifität für das natürlich vorkommende m-Xylol zum Xenobiotikum 2,4-Dinitrotoluol, das nicht natürlicherweise in Ökosystemen vorkommt. Mit phylogenetischen Analysen nah verwandter Gene besteht die Möglichkeit, Verwandtschaftsbeziehungen von Proteinen innerhalb unterschiedlicher Spezies herauszufinden. Bei α - und β -Proteobakterien konnte mit diesen Methoden der evolutionäre Ursprung zweier Gene (*nodI* und *nodJ* Gen) für die Stickstofffixierung aufgedeckt werden (van Rhijin and Vanderleyden, 1995; Suominen *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2013).

4.2.1 Architektur des extrazellulären OpuBC Proteins

Obwohl der OpuB Transporter eine nahe Verwandtschaft zum OpuC Transporter zeigt, ist sein Transportspektrum nur auf Cholin beschränkt. Ein Transport wird erst durch die Bindung des Substrates an das extrazelluläre SBP ermöglicht. Bei dem extrazellulären Rezeptor Protein OpuBC bilden zwei Proteinen Domänen (Domäne I und Domäne II) eine tiefe Kluft. Hier befindet sich die aromatische Bindungstasche, die typisch für SBP ist (Berntsson *et al.*, 2010).

Eine Mutagenese der aromatischen Aminosäuren, die den „aromatischen Cage“ bilden, führte in vorangegangenen Arbeiten zu einer dramatischen Verschlechterung der Bindung des Substrates beim SPB OpuAC in *B. subtilis*, bei AfProX aus *Archaeoglobus fulgidus* und bei EhuB bei *Sinorhizobium meliloti* (Hanekop *et al.*, 2007; Smits *et al.*, 2008; Tschapek *et al.*,

2011). Smits *et al.*, 2008 für das OpuAC Protein, Pittelkov *et al.*, 2011 für das OpuBC Protein und Du *et al.*, 2011 für das OpuCC Protein bei *B. subtilis* konnten zeigen, dass auch eine Mutagenese weiterer Aminosäuren die Bindungsaffinitäten der Substrate zum SBP verschlechterten bzw. keine Bindung mehr erlaubten.

Das extrazelluläre OpuBC Protein bindet nur Cholin und Cholin Derivate. Während die Trimethylammoniumgruppe des Cholin ebenfalls über Kationen π -Interaktionen im „aromatischen Cage“ (Tyr71, Tyr117, Tyr197 und Tyr221) stabilisiert wird, interagiert die gegenüberliegende Hydroxylgruppe direkt mit der Aminosäure Gln19. Ein Wassernetzwerk über die Aminosäuren Asp74, Tyr117 und Leu155 stabilisiert Cholin indirekt und macht die Bindungstasche sehr unflexibel und starr (siehe Abbildung 10 B) (Pittelkov *et al.*, 2011). Die Kristallstrukturen der SBP OpuBC und OpuCC zeigten bei ihrer Bindung mit den Liganden, dass neben der Koordination der Trimethylammoniumkopfgruppe in der aromatischen Bindetasche auch die Aminosäure an Position 74 einen wichtigen Beitrag zur Bindung und Stabilisierung der Liganden in den Proteinen leistet (siehe Abbildung 25) (Pittelkov *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011). In OpuBC ist die Aminosäure Asp74 an der Bildung des Wassernetzwerkes beteiligt, während die strukturell entsprechende Aminosäure (Thr74) im OpuCC Protein an der Bindung für Glycin Betain beteiligt ist. Die starke negative Ladung des Asp74 in OpuBC könnte die negativ geladenen Carboxylgruppen im Glycin Betain abstoßen. Die Aminosäure Threonin in der OpuCC Bindetasche dagegen stößt keine negativen Ladungen ab und erlaubt daher wohl die Bindung der Substrate mit Carboxylgruppen in der Bindungstasche, auch wenn die Aminosäure keine direkte Interaktion zu den Substraten ausbildet (Du *et al.*, 2011). Es konnte also vorhergesagt werden, dass die Integrität der Substratbindung zu den extrazellulären SBP durch einzelne Aminosäuren determiniert wird und einzelne Mutationen die Bindung beeinflussen.

Mit einer zielgerichteten Mutagenese wurde im OpuBC Protein die Aminosäure Asp74 in Thr74 mutiert und das rekombinante OpuBC Protein mit fünf kompatiblen Soluten für Kristallisationsstudien eingesetzt. Die Kristallstrukturanalysen des OpuBC (D74T) Proteins zeigten in Gegenwart aller fünf verwendeten kompatiblen Solute die typische Stabilisierung der positiv geladenen Kopfgruppen der Substrate über Kationen π -Interaktionen in den „aromatischen Cages“. Eine besondere Stellung bei der Bindung der Substrate kam der Aminosäure Gln19 zu, denn an dieser Aminosäure fanden direkte oder indirekte Interaktionen mit den Substraten statt und ermöglichten erst eine Bindung (siehe Abbildung 31). Die Aminosäure Gln19 war bereits an der Bindung von Cholin im Wildtyp OpuBC beteiligt und ebenso bei der Bindung von Glycin Betain und Carnitin an das OpuCC Protein (siehe

Abbildung 10 und 25) (Pittelkov *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2011). Obwohl die mutierte Aminosäure Thr74 im OpuBC (D74T) Protein nicht direkt an den Bindungen beteiligt war, sorgte der Austausch der Aminosäure Asp74 (Wildtyp OpuBC) gegen Thr74 für ein Aufbrechen des starren und unflexiblen Wassernetzwerkes im mutierten OpuBC (D74T) Protein. Zusätzlich war auch nicht mehr die negative Ladung der Asparaginsäure vorhanden, die vermutlich eine Bindung der kompatiblen Solute in der Bindungstasche verhindert hatte. Diese beiden Ereignisse durch den Austausch der Aminosäure haben für eine Erweiterung des Substratspektrums des OpuB Transporters hin zu dem des OpuC Transporters gesorgt.

4.2.2 Akkumulation von kompatiblen Soluten in Stämmen mit mutiertem OpuB bzw. OpuC Transporter

Mit dem Austausch einer einzigen Aminosäure im extrazellulären OpuBC Protein konnte das OpuB Transportsystem zu einem OpuC Transportsystem evolviert werden, das jetzt ein breites Substratprofil besitzt (siehe Abbildung 28). Durch Aufnahmeexperimenten mit radioaktiv markierten kompatiblen Soluten in *B. subtilis* Stämmen, die nur das evolvierte OpuB Transportsystem besitzen, wurden dessen kinetischen Bindeeigenschaften des mutierten OpuBC Bindeproteins für fünf kompatible Solute für das mutierte OpuB Transportsystem beschrieben (siehe Tabelle 10). Die Affinität des Transporters mit mutierten OpuBC für Cholin hat sich im Vergleich zum Wildtyp OpuB erheblich verringert. Ebenso war die Transportkapazität (V_{max}) des Systems für alle untersuchten kompatiblen Solute, im Vergleich zum OpuC Transporter, vermindert. Was besonders auffiel war, dass die Substrataffinitäten des Transporters *in vivo* (K_m/K_i) verschieden zu den Substrataffinitäten (K_d) des isolierten Bindeproteins waren. Die Bindung an das extrazelluläre SBP determiniert üblicherweise die Transportaffinität des Substrates (Berntsson *et al.*, 2010; Eitinger *et al.*, 2011; Gouridis *et al.*, 2014). Die höheren K_d Werte könnten zum einen daraus resultieren, dass das isolierte OpuBC Protein bei der Fluoreszenzspektroskopie *in vitro* nicht optimal gefaltet war. Eine Veränderung der experimentellen Bedingungen, wie die Pufferzusammensetzung oder die Temperatur, könnten die Aufrechterhaltung der nativen Konformation des Proteins positiv beeinflussen. Daneben besteht die Möglichkeit andere Expressionssysteme (z. B. *Bacillus megaterium* oder *Saccharomyces cerevisiae*) für die Proteinproduktion zu nutzen (Buckholz *et al.*, 1991; Hueck *et al.*, 1995; Malten *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012) oder alternative Messmethoden für die Bindungsaffinitäten zu benutzen (ITC oder Biacore). Des weiteren könnte das rekombinante OpuBC Protein bei den *in vitro* Experimenten ständig zwischen seiner offenen und geschlossenen Konformation switchen. Solche Konformationsänderungen wurden beim SBP ChoX von *Sinorhizobium meliloti*

(Oswald *et al.*, 2009) und AfProX in *Archaeoglobus fulgidus* (Tschapek *et al.*, 2011) beobachtet. Berntsson *et al.*, 2010 postulieren, dass die SBP vier Strukturen einnehmen und dynamisch gewechselt werden können (1. offen ohne Ligand, 2. offen mit Ligand, 3. geschlossen ohne Ligand und 4. geschlossen mit Ligand).

Die Stabilität des SBP könnte darüberhinaus auch von der Anwesenheit des gesamten Transporters abhängen. Ähnlich gravierende Unterschiede zwischen den Bindeparametern des Transportsystems *in vivo* und dem isolierten Bindeprotein konnte ich auch für das OpuC Transportsystem beobachten. Bei Du *et al.*, 2011 konnten beim mutierten rekombinanten OpuCC (T74D) Protein in Tyrosinfluoreszenz spektroskopischen Untersuchungen keine Bindungen mehr von kompatiblen Soluten gezeigt werden (außer Cholin). Meine *in vivo* Experimente in *B. subtilis* Stämmen mit dem OpuC Transportsystem (OpuCC T74D) zeigten dagegen Transport von kompatiblen Soluten (siehe Abbildung 33 und 34). Die kinetischen Parameter für den OpuC Transporter (OpuCC T74D) zeigten keine Veränderung in der Affinität zu Cholin, während die Affinitäten von Glycin Betain und Carnitin sich verschlechterten (siehe Abbildung 34). Man kann daraus folgern, dass *in vitro* Messungen mit isolierten SBP's relativ die Affinitäten verschiedener Substrate zum Bindeprotein widerspiegeln, aber nur begrenzt Schlüsse auf die Transportaffinitäten *in vivo* zulassen.

Lange Zeit standen keine hochauflösenden Strukturen kompletter ABC Transporter zur Verfügung. Mit der Aufklärung der Struktur des Maltose Transporters (MalFGK2) aus *E. coli*, dem Vitamin B12 Transporter aus *E. coli*, dem Metall Transporter Hfl470/71 aus *Haemophilus influenzae* und dem Molybdat Transporter MsbA aus *Archaeoglobus fulgidus* konnten allgemeine Transportmechanismen bei Importern studiert werden (Locher *et al.*, 2002; Oldham *et al.*, 2007; Pinkett *et al.*, 2007; Hollenstein *et al.*, 2007; Eitinger *et al.*, 2011, Oldham *et al.*, 2013; Gouridis *et al.*, 2014; ter Beek *et al.*, 2014). Allgemein wird der Transportvorgang durch das „Alternating Access“ Modell beschrieben (Borbat *et al.*, 2007; Hollenstein *et al.*, 2007; Oldham *et al.*, 2007). Dieser Mechanismus besteht aus dem Wechselspiel von offenen und geschlossenen Konformationen der SBP, TMD's und der NBD's im Zusammenspiel mit der Bindung eines Substrates und dem Transport des Substrates in das Zellinnere. In folgender Abbildung wurde der Transportvorgang der Opu Transporter in *B. subtilis* schematisch dargestellt.

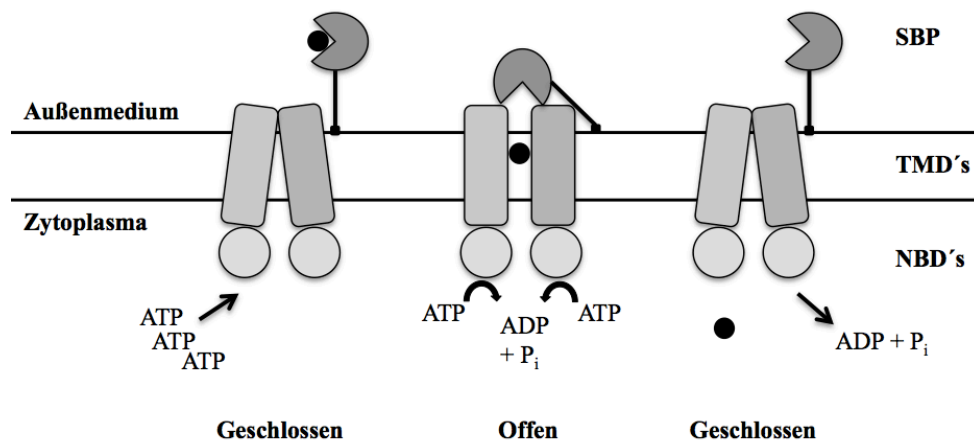


Abbildung 36: Schematische Übersicht über den Transportvorgang kompatibler Solute bei *B. subtilis*. Das Substrat im Außenmedium wird von den SBP gebunden (Links). Das SBP bringt das Substrat zu den TMD's. Bindet ATP an die NBD's führt das zu einem Konformationswechsel der TMD's. Der Kanal für den Transport des Substrates steht zur Verfügung und das Substrat wird ins Zytoplasma transportiert (Mitte). Nachdem ATP hydrolysiert wurde, löst sich das ADP + P_i von den NBD's und der Transporter geht wieder in die geschlossene Konformation über (Rechts). Modifiziert nach Oldham *et al.*, 2007; Eitinger *et al.*, 2011 und Oldham *et al.*, 2013.

Das Substrat wird vom extrazellulären SBP gebunden (Links) und von dem SBP zu den TMD's gebracht, indem das SBP aufdockt. ATP bindet an die NBP's und sorgt für einen Konformationswechsel der TMD's, die nun einen offenen Kanal für das Substrat bilden (Mitte). Für den Transportvorgang wird ATP zu ADP + P_i hydrolysiert. Die Stöchiometrie des Transportvorganges ist noch nicht eindeutig geklärt. In *in vitro* Experimenten mit dem OpuA Glycin/Betain Transporter von *Lactococcus lactis* wurden für ein Transport eines Substratmoleküls zwei Moleküle ATP verbraucht (Patzlaff *et al.*, 2003). Nachdem das Substrat durch den entstandenen Kanal in das Zytoplasma transportiert wurde, löst sich ADP von den NBP's und die TMD's nehmen wieder ihre geschlossene Konformation ein (Rechts). Der Transport von Substraten hängt nicht nur alleine vom SBP ab. Beim Maltose Transporter in *E. coli* und beim Histidin Transporter in *Salmonella typhimurium* wurden Mutanten identifiziert, die ihre Substrate in der Abwesenheit des extrazellulären SBP aufnehmen konnten (Speiser and Ames, 1991; Covitz *et al.*, 1994). Im MalFGK2 Transporter wurden Punktmutationen in den Transmembranproteinen MalF und MalG ermittelt, die zu einer Bindungsstelle für Maltose in der Pore geführt hatte. Der daraus entstandene Phänotyp zeichnete sich durch eine spontane Erhöhung der ATPase Aktivität aus. Das Maltose-Bindeprotein inhibierte diese Mutation, in dem sie den Zugang zur Bindungsstelle in den Transmembranproteinen blockierte (Dean *et al.*, 1992; Covitz *et al.*, 1994). Diese Befunde zeigen deutlich die Interaktion und gegenseitige Beeinflussung der Transporterkomponenten.

Untersucht man Transportvorgänge bei ABC Transporter, darf nicht nur alleine die Bindung der Substrate an das SBP betrachtet werden. Für eine Erfassung der Dynamik des Transportes müssen alle Transporterkomponenten miteinbezogen werden.

4.2.3 Taxonomische Verbreitung der OpuB und OpuC Transporter

Durch den Aminosäureaustausch von Asp74 in Thr74 im OpuBC Protein wurde dessen Substratspektrum erweitert. Dies zeigt, dass die Aminosäureposition 74 festlegen kann, ob es sich bei dem Transportsystem um ein „breites“ oder „enges“ System handelt. Eine BLASP-P Sequenz Analyse der extrazellulären OpuBC und OpuCC Proteine von 84 *Bacillus* Stämmen (Genome komplett sequenziert) (siehe Anhang) hat gezeigt, dass bei einem OpuB Transportertyp immer eine Asparaginsäure und beim OpuC Transportertyp immer ein Threonin an der Position 74 sitzt, diese Aminosäuren sind an dieser Position bei den Transportern hochkonserviert. Die Projektion der Sequenzanalysen auf einen 16s rRNA Stammbaum der *Bacillus* Spezies (siehe Abbildung 35) haben offenbart, dass nur in wenigen Arten der OpuB Transporter aus einer Genduplikation des OpuC Transporters entstanden ist. Bei vier *Bacillus* Arten (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* 1942, *B. sp.* JS und *B. subtilis*) hat sich im Laufe der Evolution aus dem breiten Substratspektrum des OpuC Transporters der hochspezifische OpuB Transporter entwickelt, der in diesen Stämmen nun zusammen mit einem OpuC System vorkommt. Der überwiegende Anteil der untersuchten *Bacillus* Stämme besitzt ein OpuC Transportertyp und ist vermutlich damit in der Lage eine Vielzahl von kompatiblen Soluten zu akkumulieren. Der OpuB Transporter könnte als Anpassung an den Lebensraum Erdboden entstanden sein. Cholin ist eine wichtige Komponente in eukaryontischen Zellmembranen und gelangt hauptsächlich durch verwittertes Pflanzenmaterial in die Umwelt (Kortstee, 1970; Boch *et al.*, 1994). Mikroorganismen sind in der Lage durch hydrolytische Enzyme das Cholin freizusetzen. Daher ist die Verfügbarkeit von Cholin im Erdboden sehr variabel und es sind hochaffine Transportsysteme notwendig, um Cholin akkumulieren zu können, was der OpuB Transporter bewerkstelligen kann.

4.3 Ausblick

In den letzten Jahren wurden die protektiven Eigenschaften vieler unterschiedlicher kompatibler Solute im Modellorganismus *B. subtilis* nachgewiesen. *B. subtilis* eignet sich besonders gut für die Erforschung bei der Wirkungsweise kompatibler Solute, denn viele pathogene Mikroorganismen wie z. B. *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* oder *Staphylococcus aureus* nutzen ebenfalls kompatible Solute, um in ihrer Umwelt zu überleben. Im menschlichen Blutplasma liegen Betaine in einer Konzentration von 20 bis 75 µmol/L vor

(Lever and Slow, 2010), die von pathogenen Mikroorganismen genutzt werden können. Diese Bakterien zu kultivieren erfordert besondere Sicherheitsmaßnahmen, während mit *B. subtilis* in gentechnischen Laboren der Sicherheitsstufe I gearbeitet werden darf.

In dieser Arbeit wurde DMSP als weiteres effektives Osmoprotektivum bei *B. subtilis* identifiziert, das ein nahezu identisches Protektionsmuster wie Glycin Betain aufweist. Unter Laborbedingungen wird für *B. subtilis* nur ein kompatibles Solute in das Wachstumsmedium hinzugegeben. In der Umwelt liegen zahlreiche kompatible Solute in unterschiedlichen Konzentration vor und können von *B. subtilis* akkumuliert werden. Wie sehen die intrazellulären Konzentrationen aus, wenn mehrere kompatible Solute akkumuliert werden können und wie wirkt sich diese Anhäufung von kompatiblen Soluten auf die Osmostress adaptive Prolinbiosynthese aus, dies sind Fragen, die in näherer Zeit angegangen werden sollten. Durch Analyseverfahren, wie z. B. Konzentrationsbestimmungen mit HPLC, könnten die intrazellulären Konzentrationen einer Mixtur verschiedener kompatibler Solute bestimmt werden.

Kompatible Solute besitzen alle eine ähnliche chemische Struktur und in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass teils umfangreiche Modifizierungen, wie bei den synthetischen DMSP Derivaten, dennoch zu einer Akkumulation der Substanzen führen. Als besonders potent hat sich der ABC Transporter OpuC bei *B. subtilis* für die Aufnahme der Substanzen herausgestellt. Durch eine Mutagenese wurde der OpuB Transporter zu einem OpuC ähnlichen Transporter evolviert, wodurch das Substratspektrum erweitert werden konnte. Detaillierte Studien der Transportermutante, bioinformatische Analysen und Kristallisationsexperimente offenbarten die Flexibilität von ABC Transportern. Dabei stellte sich heraus, dass nicht nur alleine die Fähigkeit der SBP für die Erkennung der Substrate entscheidend ist, sondern alle Transporterkomponenten im Komplex zusammenarbeiten, um einen Transport zu ermöglichen. Dabei spielen insbesondere das Andocken der extrazellulären SBP an die TMD's und die Affinitäten der TMD's für verschiedenen Substrate eine wichtige Rolle. Wie durch die Mutagenese Versuche gezeigt wurde, können alle kompatiblen Solute vom OpuBC (D74T) Protein gebunden werden, aber der Transportvorgang ist für diese kompatiblen Solute nicht optimal. Mit der Aminosäure Gln19 und mit der Aminosäure an der Position 74 sind wichtige Aminosäuren für die Bindung identifiziert worden. Alle diese Ergebnisse sollten auf den Transport im Komplex ausgeweitet werden. Dazu könnten weitere Mutagenese Experimente durchgeführt werden und genetische Verfahren genutzt werden, um Mutationen aufzudecken, die einen verbesserten Transport ermöglichen. Interessant dabei sind die Bereiche an denen das SBP mit dem TMD's in

Kontakt treten und die Poren-formenden Bereiche der TMDs selbst, die eventuell eigene Bindungsstellen enthalten.

5. Literaturverzeichnis

Aertsen A. and Michiels C. W. (2004) Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit Rev Microbiol* **30**: 263-273.

Akashi H. and Gojobori T. (2002) Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **99**: 3695-3700.

Ansedé J. H. and Yoch D. C. (1997) Comparison of selenium and sulfur volatilization by dimethylsulfoniopropionate lyase (DMSP) in two marine bacteria and estuarine sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **23**: 315-324.

Ansedé J.H., Pellechia P. J., and Yoch D. C. (1999) Selenium biotransformation by the salt marsh cordgrass *Spartina alterniflora*: evidence for dimethylselenoniopropionate formation. *Environ Sci Technol* **33**: 2064-2069.

Aoki S., Ito M., and Iwasaki W. (2013) From β - to α -Proteobacteria: The origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ*. *Mol Biol Evol* **30**:2494-2508.

Armstrong N. and Gouaux E. (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* **28**: 165-81.

Arora A., Ha C., and Park C. B. (2004). Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Lett* **564**: 121-125.

Auton M., Rösger J., Sinev M., Holthausen L. M., and Bolen D. W. (2011) Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and sidechains. *Biophys Chem* **159**: 90-99.

Barbe V., Cruveiller S., Kunst F., Lenoble P., Meurice G., Sekowska A., *et al.* (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**: 1758-1775.

- Barnard W. R., Andreae M. O., and Iverson R. L. (1984) Dimethylsulfide and *Phaeocystis pouchetii* in the Southeastern Bering Sea. *Continental Shelf Res* **3**: 103-113.
- Bashir A., Hoffmann T., Kempf B., Xie X., Smits S. H., and Bremer E. (2014b) The plant-derived compatible solutes proline betaine and betonine confer enhanced osmotic and temperature stress tolerance to *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **160**: 2283-2294.
- Bashir A., Hoffmann T., Smits S.H., and Bremer E. (2014a) Dimethylglycine provides salt and temperature stress protection to *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **80**: 2773-2785.
- Bayles D. O. and Wilkinson B. J. (2000) Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **30**: 23-27.
- Beckering C. L., Steil L., Weber M. H., Volker U., and Marahiel M. A. (2002) Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**: 6395-6402.
- Benga G. (2012) On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Mol Aspects Med* **33**: 514-7.
- Berntsson A. R. P., Smits S. H. J., Schmitt L., Slotboom D. J., and Poolman B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Letters* **584**: 2606-2617.
- Biemans-Oldehinkel E., Doeven M. K., and Poolman B. (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* **580**: 1023-1035.
- Boch J., Kempf B., and Bremer E. (1994) Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J Bacteriol* **176**: 5364-5371.
- Boch J., Kempf B., Schmid R., Bremer E. (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J Bacteriol* **178**: 5121-5129.

- Boch J., Nau-Wagner G., Kneip S., and Bremer E. (1997) Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch Microbiol* **168**: 282-289.
- Borbat P. P., Surendhran K., Bortolus M., Zou P., Freed J. H., and McHaourab H. S. (2007) Conformational motion of the ABC transporter MsbA induced by ATP hydrolysis. *PLoS Biol* **5**: e271.
- Bourot S., Sire O., Trautwetter A., Touze T., Wu L. F., Blanco C., and Bernard T. (2000) Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 1050-1056.
- Breier A., Gibalova L., Seres M., Barancik M., and Sulova Z. (2013) New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anticancer Agents Med Chem* **13**:159-70.
- Bremer E. (2002) Adaptation to changing osmolarity. *Bacillus subtilis* and its closest relatives, eds Sonenshein AL, Hoch JA, & Losick R (ASM Press, Washington, D.C.), pp 385-391.
- Bremer E. and Krämer R. (2000) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Bacterial stress responses*, eds Storz G & Hengge-Aronis R (ASM, Washington, D.C.), pp 79-97.
- Brigulla M., Hoffmann T., Krisp A., Völker A., Bremer E., and Völker U. (2003) Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol* **185**: 4305-4314.
- Brill J., Hoffmann T., Putzer H., and Bremer E. (2011a) T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **157**: 977-987.
- Brill J., Hoffmann T., Bleisteiner M., and Bremer E. (2011b) Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J Bacteriol* **193**: 5335-5346.

- Broy S., Chen C., Hoffmann T., Brock N. L., Nau-Wagner G., Jebbar M., Smits S. H. J., Dickschat J. S., and Bremer E. (2014) Abiotic stress protection by ecologically abundant DMSP and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* DOI: 10.1111/1462-2920.12698
- Buckholz R. G. and Gleeson M. A. G. (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Nature Biotechnology* **9**: 1067-1072.
- Budde I., Steil L., Scharf C., Volker U., and Bremer E. (2006) Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology* **152**: 831-853.
- Burkhardt J., Sewald X., Bauer B., Saum S. H., and Müller V. (2009) Synthesis of glycine betaine from choline in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: coregulation of two divergent, polycistronic operons. *Environ Microbiol Rep* **1**: 38-43.
- Bursy J., Kuhlmann A. U., Pittelkow M., Hartmann H., Jebbar M., Pierik A. J., Bremer E. (2008) Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stress. *Appl Environ Microbiol* **74**:7286-7296.
- Bursy J., Pierik, A. J., Pica N., and Bremer E. (2007) Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J Biol Chem* **282**: 31147-31155.
- Calamita G., Bishai W. R., Preston G. M., Guggino W. B., and Agre P. (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 29063-29066.
- Calamita G., Kempf B., Bonhivers M., Bishai W.R., Bremer E., and Agre P. (1998) Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **95** : 3627-3631.

Caldas T., Demont-Caulet N., Ghazi A., and Richarme G. (1999) Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* **145**: 2543-2548.

Cayley S., Lewis B. A., and Record M. T. Jr. (1992) Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**: 1586-1595.

Challenger F. and Simpson M. I. (1948) Studies on biological methylation; a precursor of the dimethyl sulphide evolved by *Polysiphonia fastigiata*; dimethyl-2-carboxyethylsulphonium hydroxide and its salts. *J Chem Soc* **3**: 1591-7

Charlson R. J., Lovelock J. E., Andreae M. O., and Warren S. G. (1987) Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* **326**: 655-661.

Chattopadhyay M. K., Kern R., Mistou M. Y., Dandekar A. M., Uratsu S.L., and Richarme G. (2004) The chemical chaperone proline relieves the thermosensitivity of a *dnaK* deletion mutant at 42 degrees C. *J Bacteriol* **186**: 8149-8152.

Chen L., DeVries A. L., and Cheng C. H. (1997) Evolution of anti-freeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3811-3816.

Chen M. Q., Wei H. B., Cao J. W., Liu R. J., Wang Y. L., and Zheng C. Y. (2007) Expression of *Bacillus subtilis proBA* genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in transgenic Arabidopsis. *Journal Of Biochemistry And Molecular Biology* **40**(3): 396-403.

Cheng J., Goldstein R., Gershenson A., Stec B., and Roberts M. F. (2013) The cation- π box is a specific phosphatidylcholine membrane targeting motif. *J Biol Chem* **288**:14863-14873.

Corratge-Faillie C., Jabnoute M., Zimmermann S., Very A. A., Fizames C., and Sentenac H. (2010) Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 2511- 2532.

Cosquer A., Ficamos M., Jebbar M., Corbel J. C., Choquet G., Fontenelle C., *et al.* (2004) Antibacterial activity of glycine betaine analogues: involvement of osmoporters. *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 2061-2065.

Cosquer A., Pichereau V., Pocard J. A., Minet J., Cormier M., and Bernard T. (1999) Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3304-3311.

Covitz K.-M.Y., Panagiotidis C. H., Hor L.-I., Reyes M., Treptow N. A., and Shuman H. A. (1994) Mutations that alter the transmembrane signalling pathway in an ATP binding cassette (ABC) transporter. *EMBO J* **13**: 1752-1759.

Csonka L. N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Review* **53**: 121-147.

Cui J. and Davidson A. L. (2011) ABC solute importers in bacteria. *Essays Biochem* **50**: 85-99.

Curson A. R., Todd J. D., Sullivan M. J., and Johnston A. W. (2011a) Catabolism of dimethylsulphonio-*propionate*: microorganisms, enzymes and genes. *Nat Rev Microbiol* **9**: 849-859.

Curson A. R., Sullivan M. J., Todd J. D., and Johnston A. W. (2011b) DddY, a periplasmic dimethylsulfoniopropionate lyase found in taxonomically diverse species of *Proteobacteria*. *ISME J* **5**: 1191-1200.

Curtis T. P. and Sloan W. T. (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 221-226.

Cutting S. M., and Vander Horn P. B. (1990). Genetic analysis, p. 27-74. In C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.

Cybulski L. E., Martin M., Mansilla M. C., Fernandez A., and Mendoza D. de. (2010) Membrane thickness cue for cold sensing in a bacterium. *Curr Biol* **20**: 1539-1544.

Davidson A. L., Dassa E., Orelle C., and Chen J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol R* **72**: 317-364.

de las Heras A. and de Lorenzo V. (2001) Cooperative amino acid changes shift the response of the σ^{54} -dependent regulator XylR from natural m-xylene towards xenobiotic 2,4-dinitrotoluenemmi. *Mol Microbio* **79**: 1248-1259.

Dean D. A., Hor L. I., Shuman H. A., and Nikaido H. (1992) Interaction between maltose-binding protein and the membraneassociated maltose transporter complex in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **6**: 2033-2040.

Dhaliwal A. K., Mohan A., and Gill K. S. (2014) Comparative analysis of ABCB1 reveals novel structural and functional conservation between monocots and dicots. *Front Plant Sci* **26**: 567.

Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D., and Goloubinoff P. (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* **276**: 39586-39591.

Dickschat J. S., Rabe P., and Citron C. A. (2014) The chemical biology of dimethylsulfoniopropionate. *The Royal Society of Chemistry* DOI: 10.1039/c4ob02407a

Dinnbier U., Limpinsel E., Schmid R., and Bakker E. P. (1988) Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol* **150**: 348-357.

Dougherty D. A and Stauffer D.A. (1990) Acetylcholine choline binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science* **250**:1558-1560.

Dougherty D. A. (2013) The cation- π interaction. *Acc Chem Res* **46**: 885-893.

- Du Y., Shi W. W., He Y. X., Yang Y. H., Zhou C. Z., and Chen Y. (2011) Structures of the substrate-binding protein provide insights into the multiple compatible solute binding specificities of the *Bacillus subtilis* ABC transporter OpuC. *Biochem J* **436**: 283-289.
- Dubnau D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **55**: 395-424.
- Earl A. M., Losick R., and Kolter R. (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **16**:269-275.
- Eitinger T., Rodionov D. A., Grote M., and Schneider E. (2010) Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 3-67.
- Ellermeier C. D., Hobbs E. C., González-Pastor J. E., and Losick R. (2006) A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell* **124**:549-559.
- Elsholz A. K., Michalik S., Zühlke D., Hecker M., and Gerth U. (2010) CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. *EMBO J* **29**: 3621-9.
- Ettoumi B., Guesmi A., Brusetti L., Borin S., Najjari A., Boudabous A., and Cherif A. (2013) Microdiversity of deep-sea *Bacillales* isolated from Tyrrhenian sea sediments as revealed by ARISA, 16S rRNA gene sequencing and BOX-PCR fingerprinting. *Microbes Environ* **28**: 361-369.
- Felder C. B., Graul R. C., Lee A. Y., Merkle H. P., and Sadee W. (1999) The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci*. **1**: 1-20.
- Fisher M. T. (2006) Proline to the rescue. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **103**: 13265-13266.
- Fletcher J. I., Haber M., Henderson M. J., and Norris M. D. (2010) ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* **10**: 147-56.
- Friedman A. M., Fischmann T. O., and Steitz T. A. (1995) Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* **268**: 1721-1727.

Galvão T. C., Mencía M., and de Lorenzo V. (2007) Emergence of novel functions in transcriptional regulators by regression to *stem* protein types. *Mol Microbio* **65**: 907-919.

Geisler M., Blakeslee J. J., Bouchard R., Lee O. R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., *et al.* (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* **44**: 179-194.

Giri J. (2011) Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 1746-1751.

Goel D., Singh A. K., Yadav V., Babbar S. B., Murata N., and Bansal K. C. (2011) Transformation of tomato with a bacterial *codA* gene enhances tolerance to salt and water stresses. *J Plant Physiol* **168**: 1286-94.

Gouesbet G., Jebbar M., Talibart R., Bernard T., and Blanco C. (1994) Pipecolic acid is an osmoprotectant for *Escherichia coli* taken up by the general osmoporters ProU and ProP. *Microbiology* **140**: 2415-2422.

Gouridis G., Schuurman-Wolters G. K., Ploetz E., Husada F., Vietrov R., de Boer M., Cordes T., and Poolman B. (2014) Conformational dynamics in substrate-binding domains influences transport in the ABC importer GlnPQ. *Nat Struct Mol Biol* **10**:1038-2929.

Graumann P., Wendrich T. M., Weber M. H., Schröder K., and Marahiel M. A. (1997) A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol* **25**:741-756.

Green N. J., Grundy F. J., and Henkin T. M. (2010) The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. *Febs Letters* **584**: 318-324.

Green R. C. (1962) Biosynthesis of dimethyl-beta-propiothetin. *J Biol Chem* **237**: 2251-4.

Hanekop N., Höing M., Sohn-Bösser L., Jebbar M., Schmitt L., and Bremer E. (2007) Crystal structure of the ligand-binding protein EhuB from *Sinorhizobium meliloti* reveals substrate recognition of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine. *J Mol Biol* **374**: 1237-1250.

- Hanson A. D., Rivoal J., Paquet L., and Gage D. A. (1994) Biosynthesis of 3-dimethylsulfoniopropionate in *Wollastonia biflora* (L.) DC. Evidence that S-methylmethionine is an intermediate. *Plant Physiol* **105**: 103-10.
- Hehemann J-H., Law A., Redecke L., and Boraston A. B. (2014) The structure of RdDddP from *Roseobacter denitrificans* reveals that DMSP lyases in the DddPFamily are metalloenzymes. *PLoS ONE* **9**: e103128.
- Higgins C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biolo* **8**:67-113.
- Hincha D. K. and Hagemann M. (2004) Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem J* **383**:277-283.
- Hoffmann T., and Bremer E. (2011) Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *J Bacteriol* **193**: 1552-1562.
- Hoffmann T., Wensin A., Brosius M., Steil L., Völker U., and Bremer E. (2013) Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J Bacteriol* **195**: 510-522.
- Holland I. B., Cole, S. P. C. Kuchler K., and Higgins, C. F. (2003) ABC Proteins: From bacteria to man. *Amsterdam: Elsevier*.
- Hollenstein K., Frei D. C., and Locher K. P. (2007) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446**: 213-216.
- Holtje J. V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:181-203.
- Holtmann G. and Bremer E. (2004) Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* **186**: 1683-1693.

- Holtmann G., Brigulla M., Steil E., Schütz A., Barnekow K., Völker U., and Bremer E. (2004) RsbV-independent induction of the SigB-dependent general stress regulon of *Bacillus subtilis* during growth at high temperature. *J Bacteriol* **186**: 6150-6158.
- Hueck C. J., Kraus A., Schmiedel D., and Hillen W. (1995) Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium*. *Mol Microbiol* **16**: 855-64.
- Ignatova Z. and Gierasch L. M. (2006) Inhibition of protein aggregation *in vitro* and *in vivo* by a natural osmoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:13357-13361.
- Jackson-Atogi R., Sinha P. K., and Rösgen J. (2013) Distinctive solvation patterns make renal osmolytes diverse. *Biophys J* **105**: 2166-2174.
- Jacobs S.A. and Khorasanizadeh S. (2002) Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**: 2080-2083.
- Jaenicke R. (1990) Protein structure and function at low temperatures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **326**: 535-553.
- Jung H. (2002) The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. *Febs Letters* **529**: 73-77.
- Kappes R. M. and Bremer E. (1998) Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and γ -butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**: 83-90.
- Kappes R. M., Kempf B., and Bremer E. (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol* **178**: 5071-5079.
- Kappes R. M., Kempf B., Kneip S., Boch J., Gade J., Meier-Wagner J., and Bremer E. (1999) Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 203-216.

- Kappes R. M. and Bremer E. (1998) Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**: 83-90.
- Karsten U., Kück K., Vogt C., and Kirst G. O. (1996) Dimethylsulfoiopropionate production in phototrophic organisms and its physiological function as a cryoprotectant. In Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds. Kiene R.P., Visscher P.T., and Keller.
- Karsten U., Wiencke C., and Kirst G. O. (1992) Dimethylsulfoiopropionate (DMSP) accumulation in green macroalgae from polar to temperate regions: interactive effects of light versus salinity and light versus temperature. *Polar Biol* **12**: 603-607.
- Kempf B. and Bremer E. (1995) OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**: 16701-13.
- Kempf B., and Bremer E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319-330.
- Kiene R. P. and Linn L. J. (2000) Distribution and turnover of dissolved DMSP and its relationship with bacterial production and dimethylsulfide in the Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography* **45**: 849-861.
- Kiene R. P., Linn L. J., and Bruton J. A. (2000) New and important roles for DMSP in marine microbial communities. *J Sea Res* **43**: 209-224.
- Kiene R. P., Linn L. J., Gonzalez J., Moran M. A., Bruton J. A. (1999) Dimethylsulfoiopropionate and methanethiol are important precursors of methionine and protein-sulfur in marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4549-4558.

- Kiene R. P., Williams L. P. H., and Walker J. E. (1998) Seawater microorganisms have a high affinity glycine betaine uptake system which also recognizes dimethylsulfoniopropionate. *Aquat Microb Ecol* **15**: 39-51.
- Kim L., Mogk A., and Schumann W. (1996) A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **28**: 71-6.
- Kimura Y., Kawasaki S., Yoshimoto H., and Takegawa K. (2010) Glycine betaine biosynthesized from glycine provides an osmolyte for cell growth and spore germination during osmotic stress in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **192**: 1467-1470.
- Klein C., Kaletta C., Schnell N., and Entian K. D. (1992) Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl Environ Microbiol* **58**: 132-142.
- Klein W., Weber M. H., and Marahiel M. A. (1999) Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol* **181**: 5341-5349.
- Kohlstedt M., Sappa P. K., Meyer H., Maass S., Zapras A., Hoffmann, T., *et al.* (2014) Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge: a multi-omics perspective. *Environ Microbiol* **16**: 1898-1917.
- Kortstee G. J. J. (1970). The aerobic decomposition of choline by microorganisms. *Arch Microbiol* **71**: 235-244.
- Lamark T., *et al.* (1991) DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1049-1064.
- Lever M. and Slow S. (2010) The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry* **43**: 732-744.

- Levine N. M., Varaljay, V. A., Toole D. A., Dacey J. W., Doney S. C., and Moran M. A. (2012) Environmental, biochemical and genetic drivers of DMSP degradation and DMS production in the Sargasso Sea. *Environ Microbiol* **14**: 1210– 1223.
- Lewis M., Chang G., Horton N. C., Kercher M. A., Pace H. C., Schumacher M. A., Brennan R. G., and Lu P. (1996) Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* **271**: 1247-1254.
- Li C. Y., Wei T. D., Zhang S. H., Chen X. L., Gao X., Wang P., *et al.* (2014) Molecular insight into bacterial cleavage of oceanic dimethylsulfoniopropionate into dimethyl sulfide. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 1026-1031.
- Lippert K. und Galinski E. A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 61-65.
- Liu Z., Tyo K. E., Martínez J. L., Petranovic D., and Nielsen J. (2012) Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **109**: 1259-1268.
- Locher K. P., Lee A. T., and Rees D. C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-1098.
- Logan N. and De Vos P. (2009) Bacillus. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.R., *etal.* (eds). Heidelberg, Germany: Springer pp: 21-128.
- Long M. and Langley C. H. (1993) Natural selection and the origin of jingwei, a chimeric processed functional gene in *Drosophila*. *Science* **260**: 91-95.
- Lopez D., Vlamakis H., and Kolter R. (2008) Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 152-163.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H. *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363-137

Ma J. C. and Dougherty D. A. (1997) The cation– π interaction. *Chem Rev* **97**:1303-1324.

Mahadevi A. S. and Sastry G. N. (2013) Cation– π interaction: its role and relevance in chemistry, biology, and material science. *Chem Rev* **113**: 2100-2138.

Malmstrom R. R., Kiene R. P., and Kirchman D. L. (2004) Identification and enumeration of bacteria assimilating dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the North Atlantic and gulf of Mexico. *Limno Oceanogr* **49**: 597-606.

Malmstrom R. R., Kiene R. P., Vila M., and Kirchman D. L. (2005) Dimethylsulfoniopropionate assimilation by *Synechococcus* in the Gulf of Mexico and northwest Atlantic Ocean. *Limnol Oceanogr* **50**:1924-1931.

Malten M., Biedendieck R., Gamer M., Drews A. C., Stammen S., Buchholz K., Dijkhuizen L., and Jahn D. (2006) A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export and one-step purification of affinity tagged heterologous levansucrase from the growth medium. *Appl Environ Microbiol* **72**:1677-9.

Mao B., Pear M., McCammon J. and Quijcho F. (1982) Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The Venus's-flytrap model. *J Biol Chem* **257**:1131-1133.

Martin M. and de Mendoza D. (2013) Regulation of *Bacillus subtilis* DesK thermosensor by lipids. *Biochem J* **451**: 269-275.

Measures J. C. (1975) Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**: 398-400.

Mecozzi S., West A. P. Jr. and Dougherty D. A. (1996). Cation- π interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10566-71.

Miller T. R., Hnilicka K., Dziedzic A., Desplats P., and Belas R. (2004) Chemotaxis of *Silicibacter* sp. strain TM1040 toward dinoflagellate products. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4692-4701.

- Miranda C. A., Martins O. B., and Clementino M. M. (2008) Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**: 297-304.
- Misono K. S. (2002) Natriuretic peptide receptor: structure and signaling. *Mol Cell Biochem* **230**: 49-60.
- Moran M. A., Reisch C. R., Kiene R. P., and Whitman W. B. (2012) Genomic insights into bacterial DMSP transformations. *Ann Rev Mar Sci* **4**: 523-542.
- Moses S., Sinner T., Zapras A., Stoeveken N., Hoffmann T., Belitsky B. R., Sonenshein A. L., and Bremer E. (2012) Proline Utilization by *Bacillus subtilis*: Uptake and Catabolism. *Journal of Bacteriology* **194**: 745-758.
- Moussatova A., Kandt C., O'Mara M. L., and Tieleman D. P. (2008) ATPbinding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1757-1771.
- Murdock L., Burke T., Coumoundouros C., Culham D. E., Deutch C. E., Ellinger J., *et al.* (2014) Analysis of strains lacking known osmolyte accumulation mechanisms reveals contributions of osmolytes and transporters to protection against abiotic stress. *Appl Environ Microbiol* **80**: 5366-5378.
- Nakajima K., Tsujiwaki S., and Nakajima Y. (2014) A tertiary sulfonium compound, dimethylsulfoniopropionate in green sea algae, completely suppresses crucial Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Anticancer Res* **34**: 4045-50.
- Nam H., Conrad T. M., and Lewis N. E. (2011) The role of cellular objectives and selective pressures in metabolic pathway evolution. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 595-600.
- Nau-Wagner G., Boch J., Le Good J. A., and Bremer E. (1999) High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 560-8.

- Nau-Wagner G., Oppen D., Rolbetzki A., Boch J., Kempf B., Hoffmann T., and Bremer E. (2012) Genetic Control of Osmoadaptive Glycine Betaine Synthesis in *Bacillus subtilis* through the Choline-Sensing and Glycine Betaine-Responsive GbsR Repressor. *Journal of Bacteriology* **194**: 2703.
- Neiditch M. B., Federle M. J., Pompeani A. J., Kelly R. C., Swem D. L., Jeffrey P. D., Bassler B. L., and Hughson F. M. (2006) Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* **126**: 1095-1108.
- Nishiguchi M. K. and Somero G. N. (1992) Temperature-dependence and concentration-dependence of compatibility of the organic osmolyte betadimethylsulfoniopropionate. *Cryobiology* **29**: 118-124.
- Noh B., Murphy A., and Spalding E. (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* **13**:2441-2454.
- Nordberg H., Cantor M., Dusheyko S., Hua S., Poliakov A., Shabalov I., *et al.* (2013) The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res* **42**: 26-31.
- Oldham M. L. and Chen J. (2011) Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science* **332**: 1202-5.
- Oldham M. L., Chen S., and Chen J. (2013) Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 18132-7.
- Oldham M. L., Khare D., Quioco F. A., Amy L. Davidson A. L., and Chen J. (2007) Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* **450**: 515-21.
- Oren A. (1990) Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**:291-298.
- Oren A. (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**:2.

- Oswald C., Smits S. H., Höing M., Bremer E., Schmitt L. (2009) Structural analysis of the choline-binding protein ChoX in a semi-closed and ligand-free conformation. *Biol Chem* **390**: 1163-70.
- Otte M. L., Wilson G., Morris J. T., and Moran B. M. (2004) Dimethylsulphoniopropionate (DMS) and related compounds in higher plants. *J Exp Bot* **55**: 1919-1925.
- Pastor J. M., Salvador M., Argandoña M., Bernal V., Reina-Bueno M., Csonka L. N., Iborra J. L., Vargas C., Nieto J. J., and Cánovas M. (2010) Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv* **28**: 782-801.
- Patzlaff J. S., van der Heide T., and Poolmann B. (2003) The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J Biol Chem* **278**: 29546-51.
- Pinkett H. W., Lee A. T., Lum P., Locher K. P., and Rees D. C. (2007) An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **315**: 373-377.
- Pittelkow M. and Bremer E. (2011) Cellular adjustment of *Bacillus subtilis* and other Bacilli to fluctuating salinities. Halophiles and hypersaline environments. - Current research and future trends, eds Ventosa A, Oren A, & (ed.) YM (Springer, Heidelberg) pp: 275-302.
- Prasad R. and Goffeau A. (2012) Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* **66**:39-63.
- Quaye O., Cowins S., and Gadda G. (2009) Contribution of flavin covalent linkage with histidine 99 to the reaction catalyzed by choline oxidase. *J Biol Chem* **284**: 16990-16997.
- Quentin Y., Fichant G., and Denizot F. (1999) Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *Journal of Molecular Biology* **287**: 467-484.
- Quinn P. K. and Bates T. S. (2011) The case against climate regulation via oceanic phytoplankton sulphur emissions. *Nature* **480**: 51-6.
- Quirocho F. A. and Ledvina P. (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol Microbiol* **20**: 17-25.

Raina J. B., Tapiolas D. M., Forêt S., Lutz A., Abrego D., Ceh J., Seneca F. O., Clode P. L., Bourne D. G., Willis B. L., and Motti C. A. (2013) DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. *Nature* **502**: 677-680.

Rapp C., Goldberger E., Tishbi N., and Kirshenbaum (2014) Cation- π interactions of methylated ammonium ions: A quantum mechanical study. *Proteins* **82**: 1494-1502.

Rea P. A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 347-375.

Reisch C. R., Moran M. A., and Whitman W. B. (2011) Bacterial catabolism of dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Front Microbiol* **2**: 172.

Rinta-Kanto J. M., Burgmann H., Gifford S. M., Sun S., Sharma S., del Valle D. A., *et al.* (2011) Analysis of sulfur-related transcription by *Roseobacter* communities using a taxon-specific functional gene microarray. *Environ Microbiol* **13**: 453-467.

Rinta-Kanto J. M., Sun S., Sharma S., Kiene R. P., and Moran M. A. (2012) Bacterial community transcription patterns during a marine phytoplankton bloom. *Environ Microbiol* **14**: 228-239.

Runde S., Molière N., Heinz A., Maisonneuve E., Janczikowski A., Elsholz A. K., Gerth U., Hecker M., and Turgay K. (2014) The role of thiol oxidative stress response in heat-induced protein aggregate formation during thermotolerance in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **91**: 1036-1052.

Salonen L. M., Bucher C., Banner D. W., Haap W., Mary J., Benz J., Kuster O., Seiler P., Schweizer W. B., and Diederich F. (2009) Cation- π interactions at the active site of factor Xa: dramatic enhancement upon stepwise N-alkylation of ammonium ions. *Ang Chem Int Ed* **48**: 811-814.

Schmitt L. and Tampé R. (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 754-760.

Schneider E. (2000). ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chemie in unserer Zeit* **2**: 90-98.

Schumacher M. A., Choi K. Y., Zalkin H. and Brennan R. G. (1994) Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: minor groove binding by alpha helices. *Science* **266**: 763-770.

Schumann W., Hecker M., and Msadek T. (2002) Regulation and function of heat-inducible genes in *Bacillus subtilis*. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives. ASM Press, Washington DC: 359-368.

Shou C., Bhardwaj N., Lam H. Y., Yan K. K., Kim P. M., Snyder M., and Gerstein M. B. (2011) Measuring the evolutionary rewiring of biological networks. *PLoS Comput Biol* **7**: e1001050.

Siefert J. L., Larios-Sanz M., Nakamura L. K., Slepecky R. A., Paul J. H., Moore E. R., *et al.* (2000) Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Current Microbiol* **41**: 84-88.

Smith J. L., Goldberg J. M., and Grossman A. D. (2014) Complete genome sequences of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* laboratory strains JH642 (AG174) and AG1839. *Genome Announc* **2**:663-614.

Smits S. H., Höing M., Lecher J., Jebbar M., Schmitt L., and Bremer E. (2008) The compatible-solute-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis*: ligand binding, site-directed mutagenesis, and crystallographic studies. *J Bacteriol* **190**: 5663-5671.

Soupene E., King N., Lee H., and Kustu S. (2002) Aquaporin Z of *Escherichia coli*: Reassessment of its regulation and physiological role. *Journal of Bacteriology* **184**: 4304-4307.

Speiser D. M. and Ames G. F-L. (1991) *Salmonella typhimurium* histidine periplasmic permease mutations that allow transport in the absence of histidine-binding protein. *J Bacteriol* **173**: 1444-1451.

Spiegelhalter F. and Bremer E. (1998) Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis* - contributions of the σ^A - and σ^B -dependent stress- responsive promoters. *Molecular Microbiology* **29**: 285-296.

- Stefels J. (2000) Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *J Sea Res* **43**: 183-197.
- Steil L., Hoffmann T., Budde I., Volker U., and Bremer E. (2003) Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Journal of Bacteriology* **185**: 6358-6370.
- Street O. T., Bolen D. W., and Rose G. D. (2006) A molecular mechanism for osmolyte induced protein stability. *PNAS* **103**: 13997-14002.
- Street T. O., Krukenberg K. A., Rosgen J., Bolen D. W., and Agard D. A. (2010) Osmolyte-induced conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Protein Sci* **19**: 57-65.
- Strocchi M., Ferrer M., Timmis K. N., and Golyshin P. N. (2006) Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics* **6**: 193-206.
- Sun L., Curson A. R., Todd J. D., and Johnston A. W. B. (2012) Diversity of DMSP transport in marine bacteria, revealed by genetic analyses. *Biogeochemistry* **110**: 121-130.
- Sunda W., Kieber D. J., Kiene R. P., and Huntsman S. (2002) An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature* **418**: 317-320.
- Suominen L., Roos C., Lortet G., Paulin L., and Lindstrom K. (2001) Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol* **18**:907-916.
- Tang C., Schwieters C. D., and Clore G. M. (2007) Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature* **449**: 1078-1082.
- Tanghe A., Van Dijck P. and Thevelein J. M. (2006) Why do microorganisms have aquaporins ? *Trends in Microbiology* **14**: 78-85.

- Tanne C., Golovina E. A., Hoekstra F. A., Meffert A., and Galinski E. A. (2014) Glass-forming property of hydroxyectoine is the cause of its superior function as a dessication protectant. *Front Microbiol* **5**: 150.
- Ter Beek J., Guskov A., and Slotboom D. J. (2014) Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* **143**: 419-435.
- Thomson, T. M., Lozano J. J., Loukili N., Carrio R., Serras F. *et al.* (2000) Fusion of the human gene for the polyubiquitination coeffectector UEV1 with Kua, a newly identified gene. *Genome Res* **10**: 1743-1756.
- Todd J. D., Rogers R., Li Y. G., Wexler M., Bond P. L., *et al.* (2007) Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria. *Science* **315**: 666-669.
- Todd, J. D., Kirkwood, M., Newton-Payne, S., and Johnston, A.W. (2012) DddW, a third DMSP lyase in a model Roseobacter marine bacterium, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *ISME J* **6**: 223-226.
- Tschapek B., Pittelkow M., Sohn-Bösser L., Holtmann G., Smits S. H. J., Gohlke H., Bremer E., and Schmitt L. (2011) Arg149 is involved in switching the low affinity, open state of the binding protein AfProX into its high affinity, closed state. *J Mol Biol* **411**: 36-52.
- Vallina S. M. and Simó R. (2007) Strong relationship between DMS and the solar radiation dose over the global surface ocean. *Science* **315**: 506-508.
- van der Heide T. and Poolman B. (2000) Osmoregulated ABC-Transporter system of *Lactococcus lactis* sense water stress via changes in the physical state of the membran. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7102-7106.
- van der Heide T. and Poolman B. (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrat-binding sites ? *EMBO Rep* **3**: 938-943.

- Van Duyl F. C., Gieskes W. W. C., Kop A. J., and Lewis W. E. (1998) Biological control of short-term variations in the concentration of DMSP and DMS during a *Phacocystis* spring bloom. *J Sea Res* **40**: 221-231.
- van Rhijn P. and Vanderleyden J. (1995) The Rhizobium–plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**: 124-142.
- Versteeg S., Escher A., Wende A., Wiegert T., and Schumann W. (2003) Regulation of the *Bacillus subtilis* heat shock gene htpG is under positive control. *J Bacteriol* **185**: 466-74
- Vila-Costa M., Simo R., Harada H., Gasol J. M., Slezak D., and Kiene R. P. (2006) Dimethylsulfoniopropionate uptake by marine phytoplankton. *Science* **314**: 652- 654.
- von Blohn C., Kempf B., Kappes R. M., & Bremer E. (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Molecular Microbiology* **25**:175-187.
- Waditee R., *et al.* (2005) Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **102**:1318-1323.
- Weber M. H. and Marahiel M. A. (2002) Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 895-907.
- Welsh D. T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 263-290.
- Whatmore A. M. and Reed R. H. (1990) Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *Journal of General Microbiology* **136**: 2521-2526.
- Widderich N., Höppner A., Pittelkow M., Heider J., Smits S. H. J., and Bremer E. (2014) Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS ONE* **9**: e93809.

- Wiegeshoff F. and Marahiel M. A. (2007) Characterization of a mutation in the acetolactate synthase of *Bacillus subtilis* that causes a cold-sensitive phenotype. *FEMS Microbiol Lett* **272**: 30-34.
- Wolfe G. V., Steinke M., and Kirst G. O. (1997) Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga. *Nature* **387**: 894-897.
- Wood J. M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and mebrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-62.
- Wood J. M. (2011) Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol* **65**: 215-238.
- Wood J. M., Bremer E., Csonka L. N., Krämer R., Poolman B., van der Heide T., and Smith L. T. (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**: 437-460.
- Yancey P. H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**: 2819-2830.
- Yoch D. C. (2002) Dimethylsulfoniopropionate: its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5804-5815.
- Yoch D. C., Ansede J. H., and Rabinowitz (1997) Evidence for intracellular and extracellular dimethylsulfoniopropionate lyases and DMSP uptake sites in two species of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3182-3188.
- Zaprasis A., Brill J., Thüring M., Wünsche G., Heun M., Barzantny H., Hoffmann T., and Bremer E. (2013) Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of proline-containing peptides. *Appl Environ Microbiol* **79**:576-587.

Zaprasis A., Hoffmann T., Wünsche G., Flórez L. A., Stülke J., and Bremer E. (2014) Mutational activation of the RocR activator and of a cryptic *rocDEF* promoter bypass loss of the initial steps of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology* **16**: 701-717.

Ziegler C., Bremer E., and Krämer R. (2010) The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol* **78**: 13-34.

6. Anhang

Tabelle 11: Bioinformatische Analyse über die Verteilung des OpuA und OpuC Transporters in *Bacillus*.

| Bacillus Stamm | OpuA | OpuC |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Campbell F, DSM 7 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CAU-B946 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CC178 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EGD-AQ14 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LFB112 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LL3 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> AS43.3 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5033 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TA208 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TrigoCor1448 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> UCMB5036 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XH7 | X | X |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2 | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> A0248 | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> A16 | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> A16R | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> Ames | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> Ames Ancestor A2084 | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> CDC 684 | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> CI | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> H9401 | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> Sterne | X | X |
| <i>Bacillus anthracis</i> SVA11 | X | X |

Fortsetzung andere Seite

Fortsetzung Tabelle

| Bacillus Stamm | OpuA | OpuC |
|----------------------------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Bacillus atrophaeus</i> 1942 | X | X |
| <i>Bacillus cellulosilyticus</i> N-4, DSM 2522 | X | |
| <i>Bacillus cereus</i> 03BB102 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> AH187 (F4810/72) | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> AH820 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> B4264 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> subsp. cytotoxis NVH 391-98 | X | |
| <i>Bacillus cereus</i> E33L (ZK) | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> F837/76 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> FRI-35 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> G9842 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> NC7401 | X | X |
| <i>Bacillus cereus</i> Q1 | X | X |
| <i>Bacillus clausii</i> KSM-K16 | X | X |
| <i>Bacillus coagulans</i> 2-6 | | X |
| <i>Bacillus coagulans</i> 36D1 | | X |
| <i>Bacillus infantis</i> NRRL B-14911 | X | X |
| <i>Bacillus licheniformis</i> 9945A | X | X |
| <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 Goettingen | X | X |
| <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 Novozymes | X | X |
| <i>Bacillus megaterium</i> DSM 319 | X | X |
| <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551 | X | X |
| <i>Bacillus megaterium</i> WSH-002 | X | X |
| <i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4 | | X |
| <i>Bacillus pumilus</i> B6033 | X | X |
| <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 | X | X |
| <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 | X | X |
| <i>Bacillus</i> sp. 1NLA3E | | X |
| <i>Bacillus</i> sp. JS | X | X |

Fortsetzung andere Seite

Fortsetzung Tabelle

| <i>Bacillus</i> Stamm | OpuA | OpuC |
|----------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> BEST7003 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> BEST7613 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> BSn5 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> natto BEST195 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> PY79 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> QB928 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10, DSM 15029 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> W23 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 168 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 6051-HGW | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> BAB-1 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> BSP1 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> RO-NN-1 | X | X |
| <i>Bacillus subtilis</i> XF-1 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> Al Hakam | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> MC28 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> sv <i>chinensis</i> CT-43 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> sv <i>konkukian</i> 97-27 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> sv. <i>finitimus</i> YBT-020 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> sv. <i>kurstaki</i> HD73 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> sv. <i>kurstaki</i> YBT-1520 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> sv. <i>thuringiensis</i> IS5056 | X | X |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518 | X | X |
| <i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 | X | X |
| <i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4 | X | X |

Tabelle 12: Alignment der OpuBC und OpuCC Proteine bei *Bacillus*.

| | | |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----|
| Bacillus_amyoliquefaciens_Campbell_DSM_7_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_DSM_7_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CAU-B946_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTSVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CAU-B946_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CC178_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CC178_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_EGD-AQ14_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTSVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_EGD-AQ14_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_IT-45_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTSVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_IT-45_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LFB112_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTSVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LFB112_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LL3_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LL3_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_AS43.3_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_AS43.3_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_FZB42_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_FZB42_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5033_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5033_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5113_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5113_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_YAU_B9601-Y2 | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTSVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_YAU_B9601-Y2_BC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_TA208_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_TA208_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_UCMB5036_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTSVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_UCMB5036_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_XH7_BC | --CSLPLGSAASEDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQMIIEHHSGLKTTVIKNLGSNAVQOOS | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_XH7_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_Y2_BC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_anthraxis_A0248 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_anthraxis_A16 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_anthraxis_A16R | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_anthraxis_Ames_Ancestor_A2084 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_anthraxis_CDC_684 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_anthraxis_H9401 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_anthraxis_Sterne | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_anthraxis_Vollum | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_atrophaeus_1942_BC | --CSLPLGSAASDDTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHNTDLTKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_atrophaeus_1942_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_cereus_03BB102 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_AH187 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTSFVFEA | 59 |
| Bacillus_cereus_AH820 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_ATCC_10987 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_B4264 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_bv.anthraxis_CI | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_E33L | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_P837/76 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_FRI-35 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_G9842 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_cereus_NC7401 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTSFVFEA | 59 |
| Bacillus_cereus_Q1 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTSFVFEA | 59 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_BC | --PIASF1Q--SDEPDLVIGGKLGPEPPIANMYKHLIEQDQTLTVEVAPLGETSVNFNA | 59 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_CC | --CSLPLGSGPSQQTIRIGTMVTESEILGQIVALLIEETDLQELITLIGSSVQVQHA | 58 |
| Bacillus_coagulans_2-6 | SLVAPNMLHKDQKTTIVIAAGKLGSEPEILNMYKLLIEENTDLKVLKTLGLGDTTFVFN | 60 |
| Bacillus_coagulans_2-6_1 | --CTLPLGSAADSQSVKIGMTNSTETQIIGYMEKMDIEHYTDIKVDMVNLGSSIVLHKA | 58 |
| Bacillus_coagulans_36D1 | --CTLPLGSAADSQSVKIGMTNSTETQIIGYMEKMDIEHYTNKIVDMVNLGSSIVLHKA | 58 |
| Bacillus_coagulans_36D1_1 | SLVAPNMLHKDQKTTIVIAAGKLGSEPEILNMYKLLIEENTDLKVLKTLGLGDTTFVFN | 60 |
| Bacillus_infantis_NRLR_L-14911 | LALFPLRGNGNEEDTIVLGRKRWTEQYILPHLSEYIKDQTDYHNVQVQBLGDTTFLPQA | 59 |
| Bacillus_infantis_NRLR_L-14911_1 | --IHWLFPVSGGSDTTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_licheniformis_9945A_CC | --CALPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_licheniformis_DSM_13_Goettingen | --CALPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_megaterium_DSM319 | --LVSPFAAMSATKPDIVIGGKIGAEQDILINMYKELIEQDTDMKVNLRSSLGKTVFVFEA | 59 |
| Bacillus_megaterium_QM_B1551 | --LVSPFAAMSATKPDIVIGGKIGAEQDILINMYKELIEQDTDMKVNLRSSLGKTVFVFEA | 59 |
| Bacillus_megaterium_WSH-002 | --LVSPFAAMSATKPDIVIGGKIGAEQDILINMYKELIEQDTDMKVNLRSSLGKTVFVFEA | 59 |
| Bacillus_methanolicus_MGA3 | --FMVLPLLGEKKDIVIAGKLGSEPEILINMYKLLIEENTDLHVELKPGFGKTSFVFN | 59 |
| Bacillus_pseudofirmus_OP4 | --PIVSSQGGGADGTLTVGGKEGAEPIIIGNMYKLLIEQDTDMTVDVQNGLGDTFVFN | 59 |
| Bacillus_pumilus_SAFR-032_CC | --CSLPLGAGSSGNTLRVGAQNTESEIIMAYMSVDIEHYTDKKTIVKNLGSNTVQQA | 58 |
| Bacillus_pumilus_SAFR-032_Permasee | --IVAGPSLPQKKEITIGGKLGSEPEILISMYKLLIEQDQIQVNLKPGLGKTSFVFN | 59 |
| Bacillus_selenitireducens_MLS10 | TVFQAPQFSDGDEPDIIVIAAGKLGAEPEIINMYKLLIEAETDYEVVLEDGFGTTDTFTEA | 59 |
| Bacillus_sp._nLA13E | --TTTTFSQVAKKDIVIGSKMFSQGLILGNMLADLIEKTDIEVERKMLNGGQVAFSA | 58 |
| Bacillus.sp._J9_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus.sp._J9_CC | --CSLPLGSGASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQMIIEHNTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus.sp._Xl(2014)_Permease | -----AKADDIVIGSKMFSQGLILGNMLADLIEYKTDIKVEKKMLNGGQVTFNA | 51 |
| Bacillus_subtilis_BEST7003_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_BEST7003_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_BSn5_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_BSn5_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subsp._natto_BEST195_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subsp._natto_BEST195_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_PY79_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_PY79_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_QB928_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_QB928_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_spizizenii_TU-B-10_DSM_15029_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_spizizenii_TU-B-10_DSM_15029_CC | --CALPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subsp._spizizenii_str._W23_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subsp._spizizenii_str._W23_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subsp._subtilis_str._168_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subsp._subtilis_str._168_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_6051-HGW_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_6051-HGW_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BAB-1_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BAB-1_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BSP1_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BSP1_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_JH642_subA6174_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_JH642_subA6174_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_RO-NN-1_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_RO-NN-1_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_XF-1_BC | --CSLPLGSAADQTTIKIGAQSMTESEIIASMLGQLEIIEHTDLKTTIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_subtilis_XF-1_CC | --CSLPLGGSASDDTIKIGAQSMTESEIIANMLAQLEIIEHTDLNTALIKNLGSNAVQOQA | 58 |
| Bacillus_thuringiensis_Al_Hakam | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_BMB171 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_Bt407 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_HD-771 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_HD-789 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_konjukian_sv_H34_97-27 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_MC28 | --IATPFLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_chinensis_CT-43 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_finitimus_YBT-020 | --MVASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_kurstaki_HD73 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_thuringiensis_IS5056 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_thuringiensis_YBT-1518 | --MIASPFLLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_toyonensis_BCT-7112 | --MIATPFLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |
| Bacillus_weihenstephanensis_KB484 | --MIATPFLWTEKKDIVIAGKLGSEPEILIQMYKQLEIQQDTDLHVQLKPGLGKTAFFVEA | 59 |

: . . * * : : * : : . : * . . . :

Fortsetzung andere Seite

Fortsetzung

| | | |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----|
| Bacillus_amyoliquefaciens_Campbell_DSM_7_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_DSM_7_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CAU-B946_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CAU-B946_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CC178_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_CC178_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_EGD-AQ14_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_EGD-AQ14_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_IT-45_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_IT-45_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LFB112_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LFB112_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LL3_BC | LQNGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFHRSYDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_LL3_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_AS43.3_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_AS43.3_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_FZB42_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_FZB42_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5033_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5033_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5113_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_UCMB5113_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_YAU_B9601-Y2 | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_plantarum_YAU_B9601-Y2_BC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_TA208_BC | LQNGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFHRSYDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_TA208_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_UCMB5036_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_UCMB5036_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_XH7_BC | LQNGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFHRSYDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_XH7_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_Y2_BC | LINGDIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALRLVQREFQNRNDMKWFDYSYGFONT | 116 |
| Bacillus_amyoliquefaciens_Y2_CC | MLGGEIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_anthraxis_A0248 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_anthraxis_A16 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_anthraxis_A16R | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_anthraxis_Ames_Ancestor_A2084 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_anthraxis_CDC_684 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_anthraxis_H9401 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_anthraxis_Sterne | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_anthraxis_Vollum | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_atrophaeus_1942_BC | LMSGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_atrophaeus_1942_CC | MVGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_cereus_03BB102 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_AH187 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_AH820 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_ATCC_10987 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_B4264 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_bv_anthraxis_CI | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_K33L | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_F837/76 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_FRI-35 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_G9842 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_NC7401 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_cereus_Q1 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_BC | LRVGDIDLY-PEPTGALVSLDLGTE--DPSYHEQTSYEQARDGLLAEYGDVLLPEMAFNT | 116 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_CC | LQVGGDIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_coagulans_2-6 | LQSKDIDLY-PEPTGALVNLKEN--PVSTDSREYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 118 |
| Bacillus_coagulans_2-6_1 | MTSGQINISAVRTGDLTSGALGM--EVPYDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_coagulans_36D1 | MTSGQINISAVRTGDLTSGALGM--EVPYDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_coagulans_36D1_1 | LQSKDIDLY-PEPTGALVNLKEN--PVSTDSREYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 118 |
| Bacillus_infantis_NRRL_B-14911 | LKSGDIDMY-VDPTGALLTIMKESYNPDSYEDINXKVKGGSEYQLEWMEPLGFONT | 119 |
| Bacillus_infantis_NRRL_B-14911_1 | LRSGDIDLY-PEPTGALVNLKEN--PVSTDSREYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 118 |
| Bacillus_licheniformis_9945A_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_licheniformis_DSM_13_Goettingen | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_megaterium_DSM319 | LRNKEIDLY-PEPTGALVTHLKEQ--PDSKDETEYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 117 |
| Bacillus_megaterium_QM_B1551 | LRNKEIDLY-PEPTGALVTHLKEQ--PDSKDETEYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 117 |
| Bacillus_megaterium_WSH-002 | LRNKEIDLY-PEPTGALVTHLKEQ--PDSKDETEYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 117 |
| Bacillus_methanolicus_MGA3 | LKSGSIDY-PEPTGALVSEFLKET--AVSTDRQEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_pseudofirmus_OF4 | LRVGDIDMY-LEPSSGVLGDLNTE--DPSYDEREAYEQARDGIYAEQVLFLEPMYHNT | 117 |
| Bacillus_pumilus_SAFR-032_CC | MENGIDIDIAATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_pumilus_SAFR-032_Permasee | LRSGDIDY-PEPTGALVNLKEN--PVSTDSREYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 118 |
| Bacillus_selenitireducens_MLS10 | LRAGEIDGY-PEPTGALVNLKEN--PVSTDSREYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 118 |
| Bacillus_sp._1NLA3E | LMNGDIDLY-VEPTGALVNLKEN--PVSTDSREYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 115 |
| Bacillus_sp._J8_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus.sp._J8_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus.sp._X1(2014)_Permease | INTGNIDYV-VEPTGALVNLKEN--PVSTDSREYVQAQKEGMAKKYNNMVLKPMKFNT | 118 |
| Bacillus_subtilis_BEST7003_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_BEST7003_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_BSn5_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_BSn5_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subsp._natto_BEST195_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subsp._natto_BEST195_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_PV79_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_PV79_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_QB928_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_QB928_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_spizizenii_TU-B-10_DSM_15029_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_spizizenii_TU-B-10_DSM_15029_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subsp._spizizenii_str._W23_BC | LMNREIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subsp._spizizenii_str._W23_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subsp._subtilis_str._168_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subsp._subtilis_str._168_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_6051-HGW_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_6051-HGW_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BAB-1_BC | LINGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BAB-1_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BSP1_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BSP1_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_JH642_subAG174_BC | LMNGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_JH642_subAG174_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_RO-NN-1_BC | LMNDEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_RO-NN-1_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_XF-1_BC | LINGEIDIAATRTGGALDTGLTLM--EPEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_subtilis_XF-1_CC | MLGGDIDISATRTSGDLTSTLGM--EAEKDPKALSIQVKEFEKFRFHYKWFDSYGFENT | 116 |
| Bacillus_thuringiensis_Al_Hakam | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_BMB171 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_Bt407 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_HD-771 | LKSGEVDYV-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_HD-789 | LKSGEVDYV-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_konkukian_sv_H34_97-27 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_MC28 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_chinensis_CT-43 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_finitimus_YBT-020 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_kurstaki_HD73 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_thuringiensis_Is5056 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_thuringiensis_YBT-1518 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_toyonensis_BCT-7112 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |
| Bacillus_weihenstephanensis_KBAB4 | LKSGEVDIY-PEPSSGALSTFFVKEE--PKSTNRDEVYEQARVGEKKYNNMVLKPMYEYNT | 117 |

176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994

| | | |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----|
| Bacillus_amilyloliquefaciens_Campbell_DSM_7_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPVDRVLKEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_DSMT7_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_CAU-B946_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVHLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_CAU-B946_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_CC1718_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_CC1718_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_EGD-AQ14_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_EGD-AQ14_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_IT-45_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVHLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_LF1B12_BC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_LF1B12_CC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVRLKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_LL3_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_AS43.3_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_AS43.3_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_FZ842_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_FZ842_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDKKRFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_UCMB5033_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_UCMB5033_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_UCMB5113_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_UCMB5113_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_YAU_B9601-V2 | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_plantarum_YAU_B9601-V2_BC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_TA208_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVRLKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_TA208_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_UCMB5036_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_UCMB5036_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_XH7_BC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPVDRVLKEHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_XH7_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_amilyloliquefaciens_Y2_CC | MQIGLVYDALKSRKMDIALASTDGRITAYGLTKLDDKKRFFPPDCSPVPDVQLVKLEHP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_A0248 | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPDSVLKQHP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_A16 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_A16R | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_Ames_Ancestor_A2084 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_CDC_684 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_H9401 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_Sterne | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_anthraxis_Vollum | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_atropheus_1942_BC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDKKRFFPPDCSPVPEKVLKEHP | 236 |
| Bacillus_atropheus_1942_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDQKFFPPDCSPVPEKVLKQHP | 236 |
| Bacillus_cereus_03850102 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_AH187 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_ATCC10920 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_ATC8 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_B4264 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_bv.anthraxis_CI | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_E33L | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_F837/76 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_FRI-35 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_G9842 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_NC7401 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_cereus_O1 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLOQYP | 236 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_BC | IDVSTGYTANPQGVVVDVTDGIRIYQVDMVVLDQKFFPPCGAPILSVKKAITEE | 236 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_CC | INMVGLEYAASAGHMdVLAASDGRIOEQYNVLVEDDKRFFPPDASPVRNEVLQYP | 235 |
| Bacillus_coagulans_2-6 | MDPSVRHYAHQQGVKNMNAASDGLQRHYVLKDDQKFFPPCGSPLLRQETVDKY | 236 |
| Bacillus_coagulans_2-6_1 | MELGLVYKAVSKGADVLANSTDGRINAYNLMLDDKHFFPPDASPVRDRTLQHP | 236 |
| Bacillus_coagulans_36D1 | MELGLVYKAVSKGADVLANSTDGRINAYNLMLDDKHFFPPDASPVRDRTLQHP | 236 |
| Bacillus_coagulans_36D1_1 | MDPSVRHYAQGVKNMNAASDGLQRHYVLVEDDKHFFPPCGSPLLRQETVDKY | 236 |
| Bacillus_infantis_NRRLL_B-14911 | LQANLMRYSAOGEVNDIAIPATDGRIVRFGLVLDDQKFFPPYAAP1IKQETLAKYP | 238 |
| Bacillus_infantis_NRRLL_B-14911_1 | MEPKLRYSATISQSGVNVIDASTDSELEQYGLKALKDDGGLFPFGAPILRKETLDDHP | 236 |
| Bacillus_licheniformis_99454_CC | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANSTDGRIKAYDLKLKDDKKRFFPPDCSPVPEKVLKEHP | 236 |
| Bacillus_licheniformis_DSM_13_Goettingen | MQIGLVYDAVNGKMdAVLANST | |

| | | |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----|
| Bacillus_amyololiquefaciens_Campbell_DSM_7_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGQLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_DSM_7_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGKLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_CAU-B946_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_CAU-B946_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGKLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_CC178_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_CC178_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_EGD-AQ14_BC | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_EGD-AQ14_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_IT-45_BC | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_IT-45_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_LFB112_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_LFB112_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_LL3_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGQLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_LL3_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_AS43.3_BC | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_AS43.3_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_FZB42_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_FZB42_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_UCMB5033_BC | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_UCMB5033_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_UCMB5113_BC | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_UCMB5113_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_YAU_B9601-Y2 | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_plantarum_YAU_B9601-Y2_BC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_TA208_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGQLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_TA208_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_UCMB5036_BC | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_UCMB5036_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_XH7_BC | ELEGVINQMIGAIDTKMMQKMNYEVDGQLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_XH7_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_Y2_BC | ELEGVINKMIGAIDTKMMQKMNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_amyololiquefaciens_Y2_CC | ELKGIVNKLIGKIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_anthraxis_A0248 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_anthraxis_A16 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_anthraxis_A16R | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_anthraxis_Ames_Ancestor_A2084 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_anthraxis_CDC_684 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_anthraxis_H9401 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_anthraxis_Sterne | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_anthracis_Vollum | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_atrophaeus_1942_BC | ELEGIIQKMLGQIDTETMQELNYEVDGKLKEPSVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_atrophaeus_1942_CC | ELEGLLNKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHDFYFE----- | 283 |
| Bacillus_cereus_03B102 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_AH187 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_AH820 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_ATCC_10987 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_B4264 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_bv.anthraxis_CI | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_E33L | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_F837/76 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_FRI-35 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_G9842 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_NC7401 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_cereus_Q1 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_BC | ELESTINLQAGIVFETSELAQGVNINDEDPYVAGFELQEKLLKQEK----- | 285 |
| Bacillus_clausii_KSM-K16_CC | ELSPLLERLTCGTTTTEKMQELNYMAOVBLKNPLVAQTFLEENNYFKDKESH----- | 288 |
| Bacillus_coagulans_2-6 | E1VPALNKLAKG1TNTQMOKMNYEVGVGKKAEDVARAFVKEGLLKK----- | 284 |
| Bacillus_coagulans_2-6_1 | ELRKVLQKLVGKIDTKTMQQLNYESDVEMKEPSTVAAKEYLEKHHYFEFG----- | 285 |
| Bacillus_coagulans_36D1 | ELRKVLQKLVGKIDTKTMQQLNYESDVEMKEPSTVAAKEYLEKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_coagulans_36D1_1 | E1VPALNKLAKG1TNTQMOKMNYEVGVGKKAEDVARAFVKEGLLKK----- | 284 |
| Bacillus_infantis_NRRL_B-14911 | ELEEIVNRLGNQISEEEMAENMARVDLKENPREVAIDPLQKQNLID----- | 285 |
| Bacillus_infantis_NRRL_B-14911_1 | E1ADALNKLAKG1TDDQMREMNKYVNVGMSAEDTAREFLKNEGLIE----- | 283 |
| Bacillus_licheniformis_9945A_CC | ELKETINKLIGKIDTETMQELNYEVDGKLKEPSVAAEFLKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_licheniformis_DSM_13_Goettingen | ELEETINKLIGKIDTETMQELNYEVDGKLKEPSVAAEFLKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_megaterium_DSM319 | ELKKILNLQGLGKISDEEMRMNYQVNAKGTAEEVAHQFLVKKGLIRE----- | 284 |
| Bacillus_megaterium_QM_B1551 | ELKKILNLQGLGKISDEEMRMNYQVNAKGTAEEVAHQFLVKKGLIK----- | 283 |
| Bacillus_megaterium_WSH-002 | ELKKILNLQGLGKISDEEMRMNYQVNAKGTAEEVAHQFLVKKGLIKE----- | 284 |
| Bacillus_methanolicus_MGA3 | E1KEALNKLAKG1TDDQMREMNKYVNVGKSAEVAEYLEKHKGLI----- | 282 |
| Bacillus_pseudofirmus_OF4 | ELKEILNLQAGM1TEETIQQMNYRVDYDDNEPDVAREFLQEKGFQ----- | 283 |
| Bacillus_pumilus_SAFR-032_CC | GLDKVINRLIGKIDTEQMQLNYEVDGQLQEPATVAKNPLKHHYFE----- | 283 |
| Bacillus_pumilus_SAFR-032_Permese | E1ETSLNKLGCQITDDEMRMNNEVNVNGQDAFQVAKAYLKKKKLLH----- | 283 |
| Bacillus_selenitireducens_MLS10 | E1EDVLNLQGLMITEEMLQMNQYQVDEEDRNAVDAREYLEESGLLTP----- | 285 |
| Bacillus_sp._1NLA3E | ELRDATNSLSGKLIDEEMRKMLKYVNDLSKQAPAKVAAKEYLEKENLLK----- | 281 |
| Bacillus.sp._JS_BC | ELEGIIKKMIGKIDTATMQALNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHYFES----- | 284 |
| Bacillus.sp._JS_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus.sp._X1(2014)_Permease | ELKKVINLLAGKLTEEMKRELNYKVDSLQSPKVAEFLIKE----- | 269 |
| Bacillus_subtilis_BEST7003_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_BEST7003_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_BSN5_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_BSN5_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subsp._natto_BEST195_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subsp._natto_BEST195_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_PY79_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_PY79_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_QB928_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_QB928_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_spizizenii_TU-B-10_DSM_15029_BC | ELEGTIQMKIGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_spizizenii_TU-B-10_DSM_15029_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subsp._spizizenii_str._W23_BC | ELEGTIQMKIGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subsp._spizizenii_str._W23_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subsp._subtilis_str._168_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subsp._subtilis_str._168_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_6051-HGW_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_6051-HGW_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BAB-1_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BAB-1_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BSP1_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_BSP1_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_JH642_subAG174_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_JH642_subAG174_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_RO-NN-1_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_subtilis_RO-NN-1_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_subtilis_XF-1_BC | ELEGIIKKMLGKIDTATMQELNYEVDGNLKEPSVAAKEYLEKHHRYFES----- | 284 |
| Bacillus_subtilis_XF-1_CC | ELEGVINKLIGQIDTETMQELNYEVDGRLKEPSVAAKEYLEKHHYFD----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_Al_Hakam | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_BMB171 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_Bt407 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_HD-771 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_HD-789 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_konkukian_sv_H34_97-27 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_MC28 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_chinensis_CT-43 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_finitimus_YB-020 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_kurstaki_HD73 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_sv_thuringiensis_IS0506 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_thuringiensis_YB-1518 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_toyonensis_BCT-712 | ELEKVLNKLAKG1TDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |
| Bacillus_weihenstephanensis_KBAB4 | ELEKVLNKLSGKITDEEMRKMNNEVNVNGKNSSEVAKQFLQKENLLR----- | 283 |

! ! ! ! ! *

Dargestellt ist das Aminosäuresequenz Alignment der extrazellulären OpuBC und OpuCC Proteine (ohne Signalsequenz) von 81 *Bacillus* Genomen. Grün markiert sind die aromatischen Aminosäuren, die den „aromatischen Cage“ für die Stabilisierung der Trimethylgruppen bilden. Grau markiert sind die Aminosäuren die eine Bindung zu den Carboxylgruppen der kompatiblen Solute bilden. Rot (OpuBC) und Blau (OpuCC) sind die Aminosäuren auf der Position 74 markiert. Beim OpuB Transporter sitzt an dieser Position ein Asp (D), während beim OpuC Transporter ein Thr (T) vorhanden ist (Pittelkov *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2011).

Das Alignment der SBP von 81 *Bacillus* Genomen (vollständig sequenziert) zeigte, dass die aromatischen Aminosäuren die den „aromatischen Cage“ bilden hochkonserviert waren (Grün). An der Aminosäure Position 74 befindet sich immer ein D bei OpuB Transportern (Blau) und ein T bei OpuC Transportertypen (Rot). Wurde ein OpuB Transporter bei den *Bacillus* Stämmen gefunden, lag immer in unmittelbarer Nachbarschaft im Genom auch ein *opuC* Operon.

Mit den gefundenen Sequenzen der verschiedenen SBP der *Bacillus* Stämme wurde ein Stammbaum der SBP erstellt und die Organisation der Transporter im Genom betrachtet.

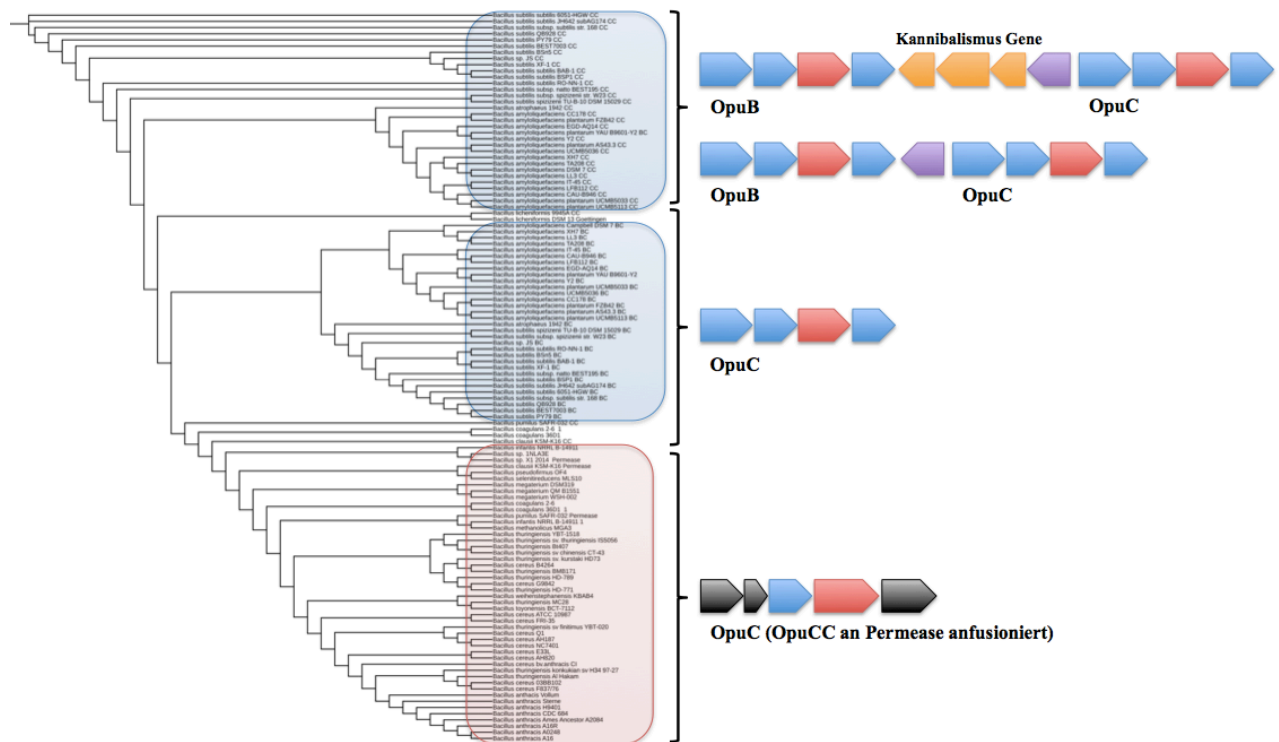


Abbildung 37: Phylogenie der extrazellulären SBP OpuBC und OpuCC und ihre Organisation im Genom der Gattung *Bacillus*. Phylogenetischer Baum der alignierten SBP OpuBC und OpuCC von 81 *Bacillus* Genomen. Blau markiert sind die Stämme die ein OpuB und OpuC Transporter besitzen (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* 1942, *B. sp.* JS und *B. subtilis*). Alle anderen Stämme besitzen ausschließlich ein OpuC Transportertyp und einige *Bacillus* Stämme (rot markiert) besitzen eine OpuC Transportertyp bei dem das SBP an die Permease anfusioniert ist.

Von 84 analysierten Genomen besaßen 77 Stämme ein OpuC Transportertyp und 4 Stämme ein OpuC Transporter zusammen mit einem OpuB Transporter. Hierbei war besonders interessant das bei einigen Stämmen, die ein OpuC Transportertyp besaßen, das SBP an der Permease fusioniert war. Solche fusionierten Transporter wurden bereits bei OpuA Transportertypen identifiziert (van der Heide and Poolman, 2000; van der Heide and Poolman, 2002; Smits *et al.*, 2008).

7. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bremer für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Weiterhin bedanke ich mich für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und für die ausgezeichnete intensive Betreuung.

Des weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thanbichler, Herrn Prof. Dr. Bölker und Herrn Prof. Dr. Lingelbach, die sich bereit erklärt haben als Gutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Allen Bremerlingen danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und für die freundliche Aufnahme ins Labor. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Tamara Hoffmann für ihre freundliche, geduldige und hilfsbereite Unterstützung beim täglichen Arbeiten im Labor.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Leuten in der Mikrobiologie bedanken (AG Bremer, AG Heider und AG Buckel). Unsere glorreichen MPI Fußballturniere bleiben unvergessen.

Ein großer Dank gilt allen Freunden, die mich in den letzten Jahren begleitet haben. Obwohl ich Berlin verlassen haben sind wir alle weiterhin in Kontakt geblieben. Sebastian, Patrick und Sonata möchte ich für die ein oder andere Partynacht in Marburg danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und besonders meinen Eltern. Ihre stetige Unterstützung hat mir über die Jahre viel Kraft verliehen.

8. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Das marine Dimethylpropionat als protektives Osmolyt und die Evolution verwandter ABC Transporter für die Aufnahme von kompatiblen Soluten“

selbständig verfasst und keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Textstellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen wurden, sind mit einer Quellenangabe kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Sebastian Broy

Ort, Datum

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

| | |
|---------------|---------------------|
| Name | Sebastian Broy |
| Geburtsdatum | 14. August 1981 |
| Nationalität | deutsch |
| Familienstand | ledig, keine Kinder |

Ausbildung

| | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 03/2015 | Promotion Fachbereich Mikrobiologie Philipps-Universität Marburg Titel der Dissertation: „Das marine Dimethylpropionat als protektives Osmolyt und die Evolution verwandter ABC Transporter für die Aufnahme von kompatiblen Soluten“ |
| 04/2005 bis 06/2011 | Studium der Biologie Freie Universität Berlin <ul style="list-style-type: none">Schwerpunkt Genetik, Mikrobiologie und Molekularbiologie Titel der Diplomarbeit am Robert-Koch-Institut Berlin: „Expression potentieller miRNAs und mRNAs von nicht-infizierten und mit <i>M. avium</i> -infizierten Akanthamoeben“ |
| 10/2004 bis 04/2005 | Studium der Biologie Ruhr-Universität Bochum |
| 6/2002 | Abitur Bettina-von-Arnim-Oberschule, Berlin |

Sprachen

| | |
|----------|-----|
| Englisch | gut |
|----------|-----|

EDV

| | |
|---------------|-----------------|
| MS Word | sehr gut |
| MS Excel | sehr gut |
| MS PowerPoint | sehr gut |
| MS Access | Grundkenntnisse |
| GIMP 2 | Grundkenntnisse |
| Photoshop | gut |
| Prism | sehr gut |

Wehrdienst

| | |
|-------------------|---------------------------------------------|
| 07/2002 – 04/2003 | Jägerbataillon 1 Berlin; Panzerbataillon 42 |
|-------------------|---------------------------------------------|